

## ENT COOPERATION TREA

PCT

**NOTIFICATION OF ELECTION**  
**(PCT Rule 61.2)**

## From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 17 September 1999 (17.09.99)	in its capacity as elected Office
<b>International application No.</b> PCT/EP98/08382	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 0050/048715
<b>International filing date (day/month/year)</b> 18 December 1998 (18.12.98)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 15 January 1998 (15.01.98)
<b>Applicant</b>	

**Applicant**

POMPEJUS, Markus et al

**1. The designated Office is hereby notified of its election made:**

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 August 1999 (12.08.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

## 2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p><b>The International Bureau of WIPO</b> <b>34, chemin des Colombettes</b> <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b></p>	<p><b>Authorized officer</b></p> <p><b>F. Baechler</b></p>
<p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>

7  
11/11

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

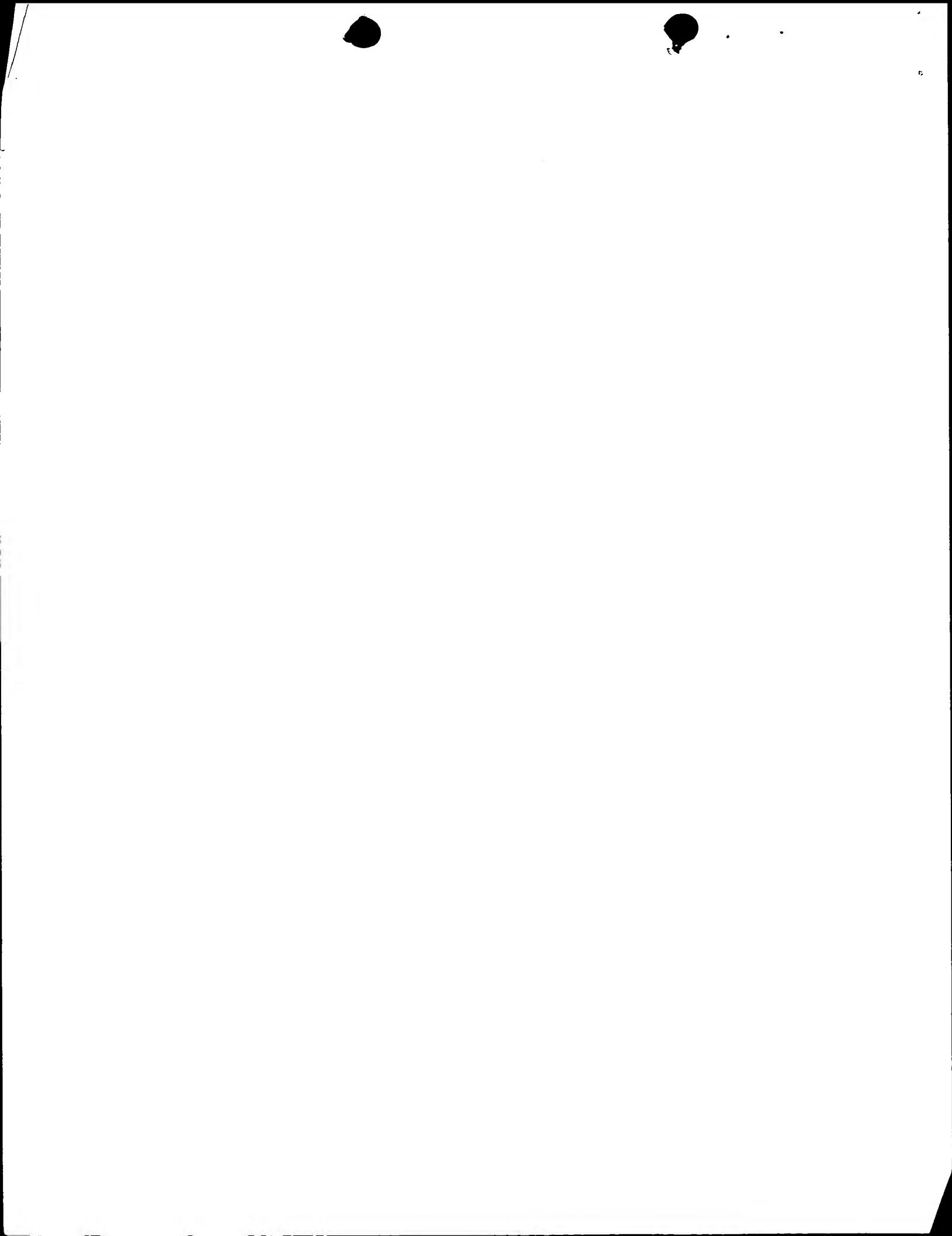
## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0050/048715	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/08382	International filing date (day/month/year) 18 December 1998 (18.12.98)	Priority date (day/month/year) 15 January 1998 (15.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</li> <li>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</li> </ol> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<ol style="list-style-type: none"> <li>3. This report contains indications relating to the following items:           <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul> </li> </ol>

Date of submission of the demand 12 August 1999 (12.08.99)	Date of completion of this report 05 April 2000 (05.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08382

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-19, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-15, filed with the letter of 16 February 2000 (16.02.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

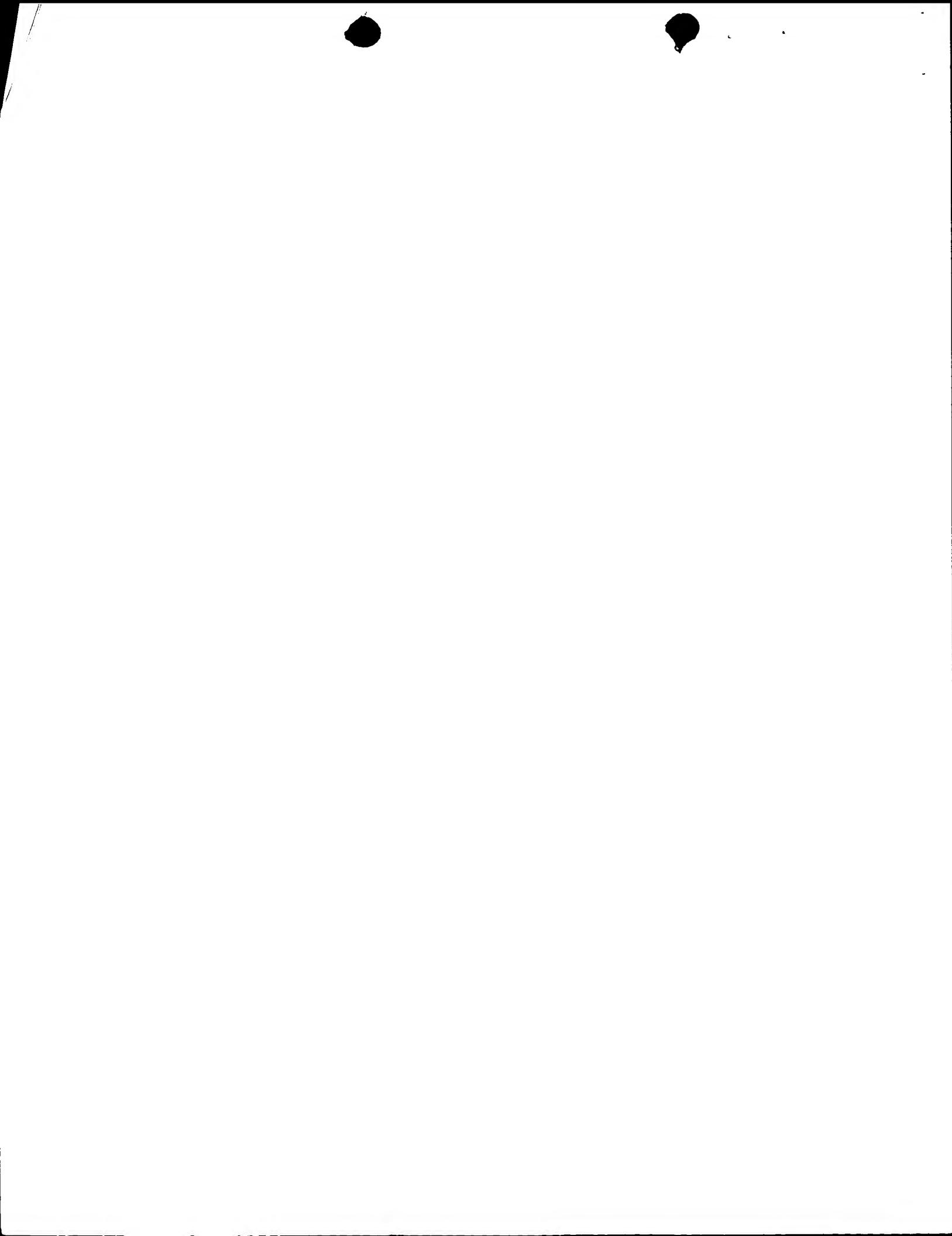
the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/08382

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

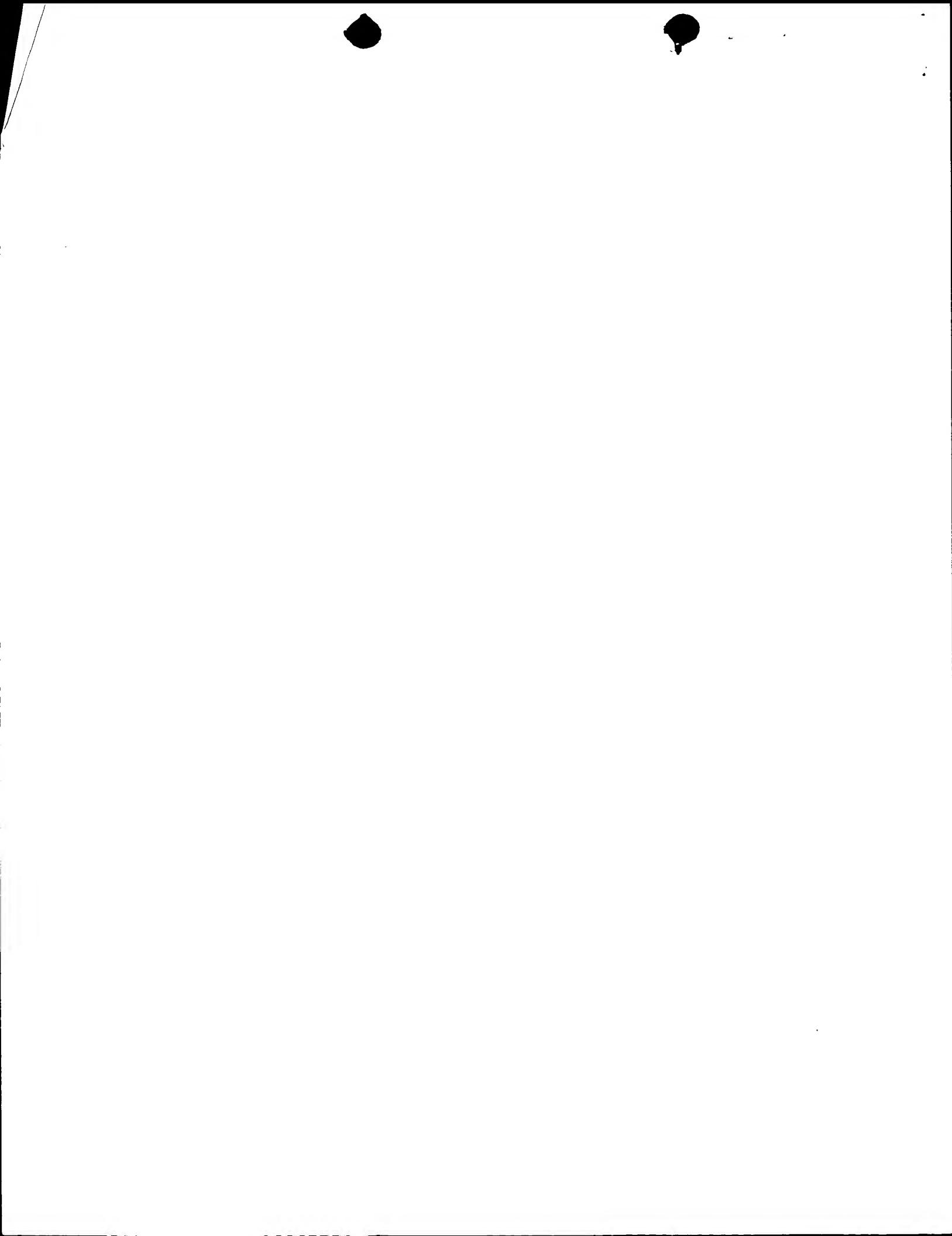
## 2. Citations and explanations

1.1 The application describes the cloning of an orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*ura3*) from *Ashbya gossypii*, as well as the use thereof for producing auxotrophic *A. gossypii* strains.

## 1.2 Novelty and inventive step

The claimed nucleic acid sequences are not disclosed by the cited prior art and are therefore novel. The closest related known gene from *Candida glabrata* (Zhou et al., 1994) has approximately 68% sequence homology.

The prior art describes a number of homologous genes from a number of biotechnically interesting micro-organisms, as well as methods for the cloning thereof (see the literature cited in the search report). Consequently the cloning of the corresponding gene from *A. gossypii* and the use thereof would at first appear obvious. However, since cloning using the method that is obvious to a person skilled in the art would not lead to any useable result, and only exceptionally expensive methods would lead to the aim being striven for, an



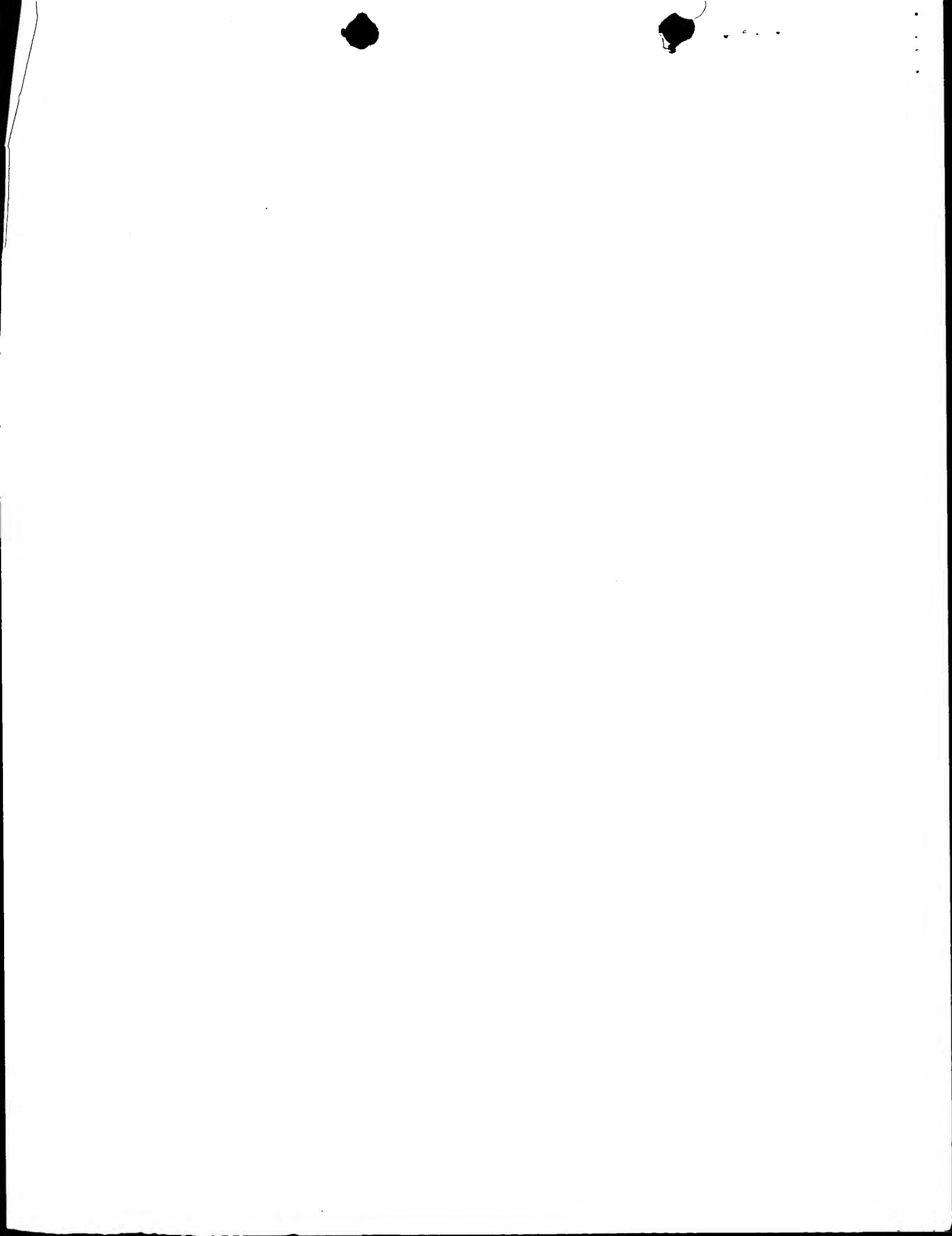
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/08382

inventive step can be acknowledged for the claimed sequences from *A. gossypii* (Seq. ID No. 1).

The claims relating to the gene and the use thereof are therefore considered inventive.



T6

# VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

**PCT**

REC'D 10 APR 2000

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

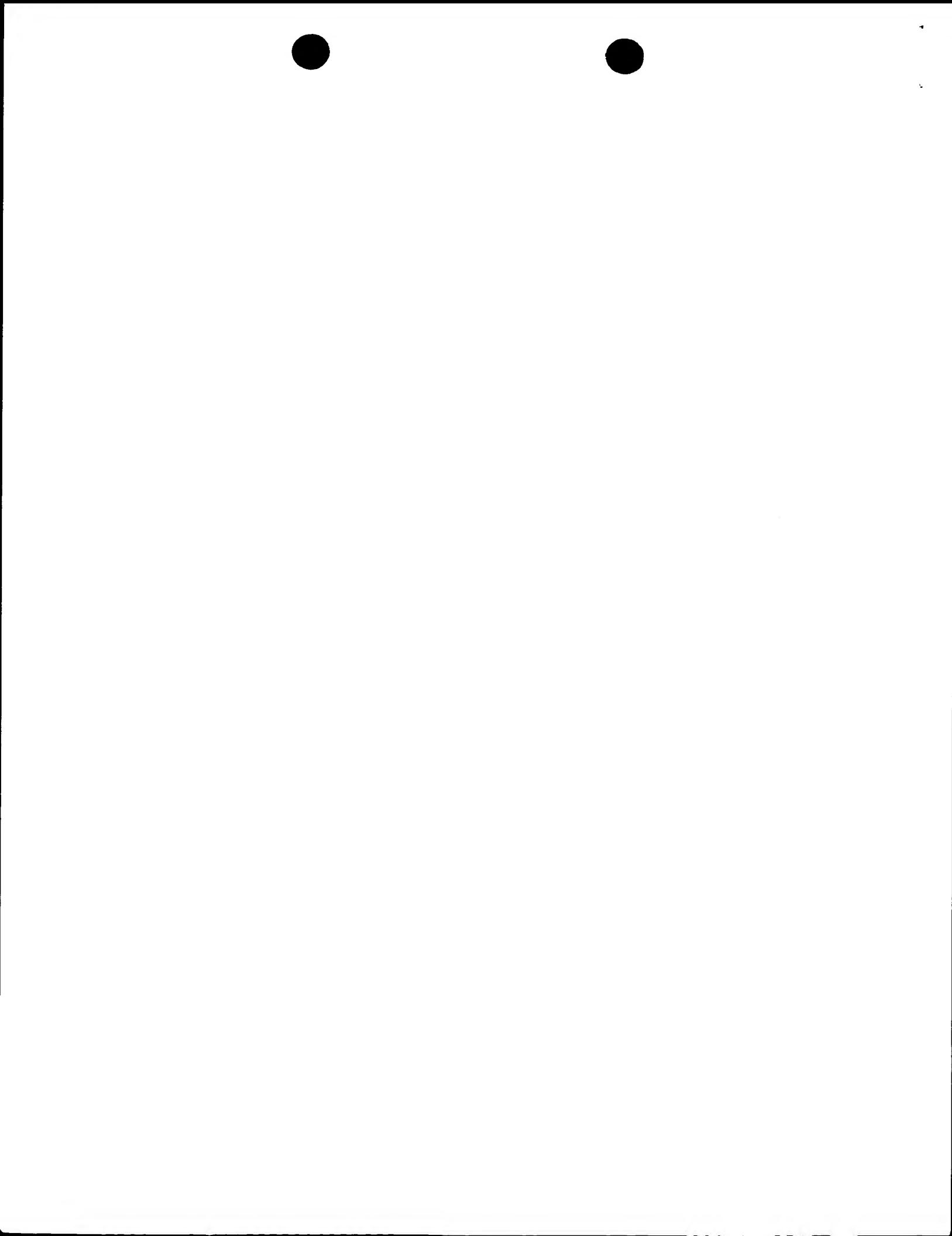
(Artikel 36 und Regel 70 PCT):

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/048715	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08382	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/12/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  <input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:  I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/08/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.04.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Stolz, B Tel. Nr. +49 89 2399 8416





## **INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08382

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

## 1-19 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-15 eingegangen am 16/02/2000 mit Schreiben vom 16/02/2000

### **Zeichnungen, Blätter:**

1/1 ursprüngliche Fassung

## 2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten: \_\_\_\_\_
- Ansprüche, Nr.: \_\_\_\_\_
- Zeichnungen, Blatt: \_\_\_\_\_

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

#### 4 Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

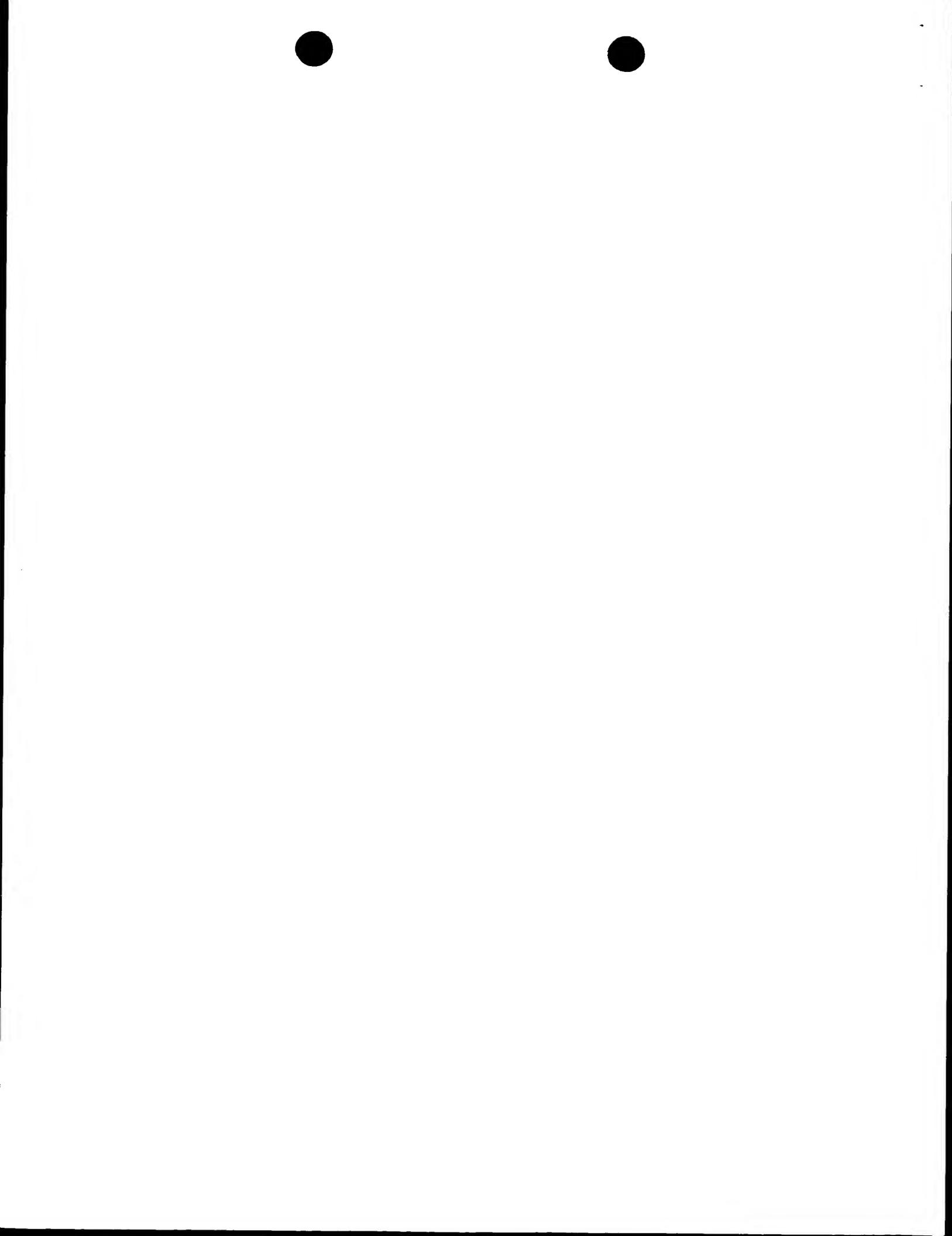
**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

## 1. Feststellung

**Neuheit (N)** Ja: Ansprüche 1-15  
Nein: Ansprüche

**Erfinderische Tätigkeit (ET)** Ja: Ansprüche 1-15  
Nein: Ansprüche

**Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)** Ja: Ansprüche 1-15  
Nein: Ansprüche

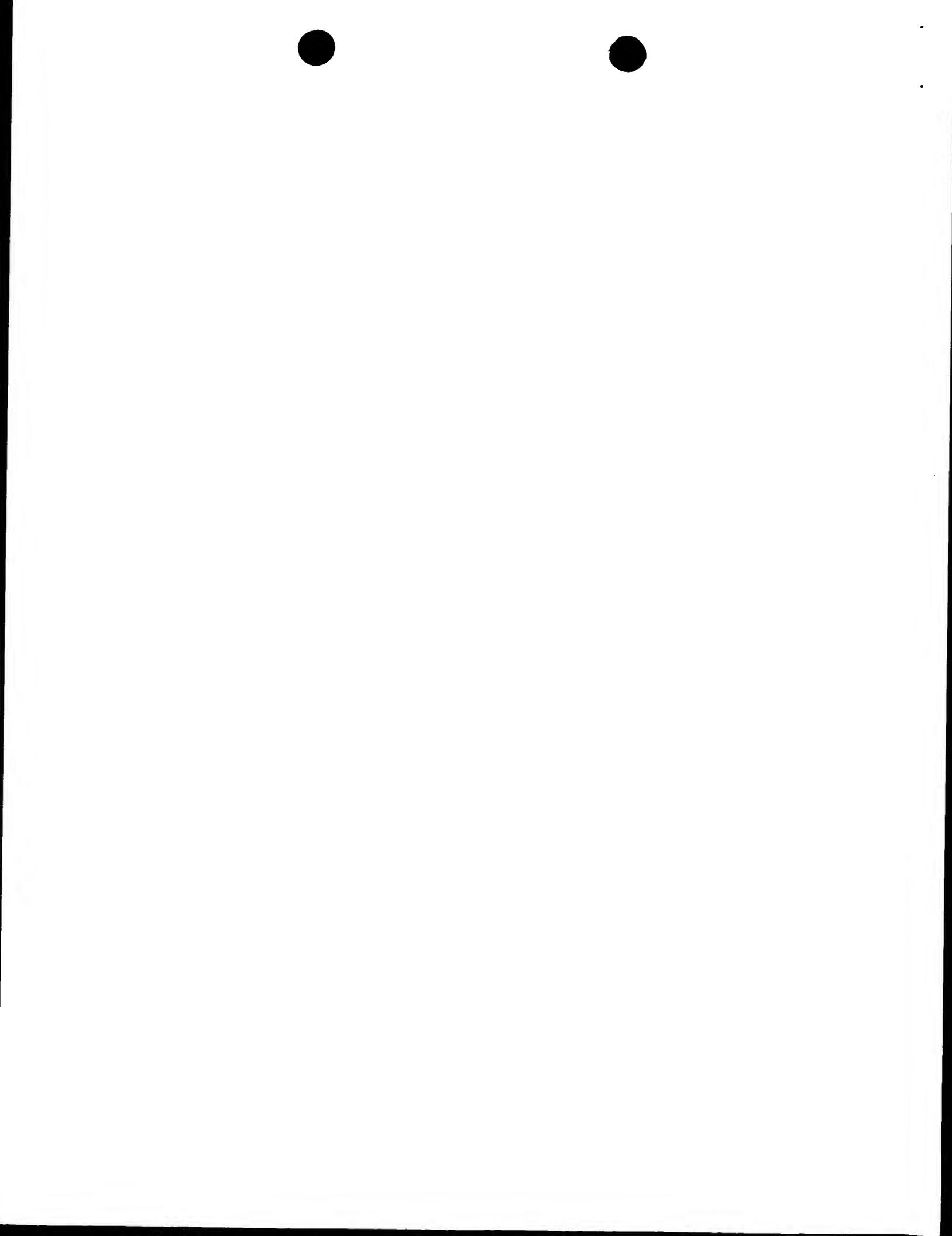


**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08382

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**



1. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) PCT

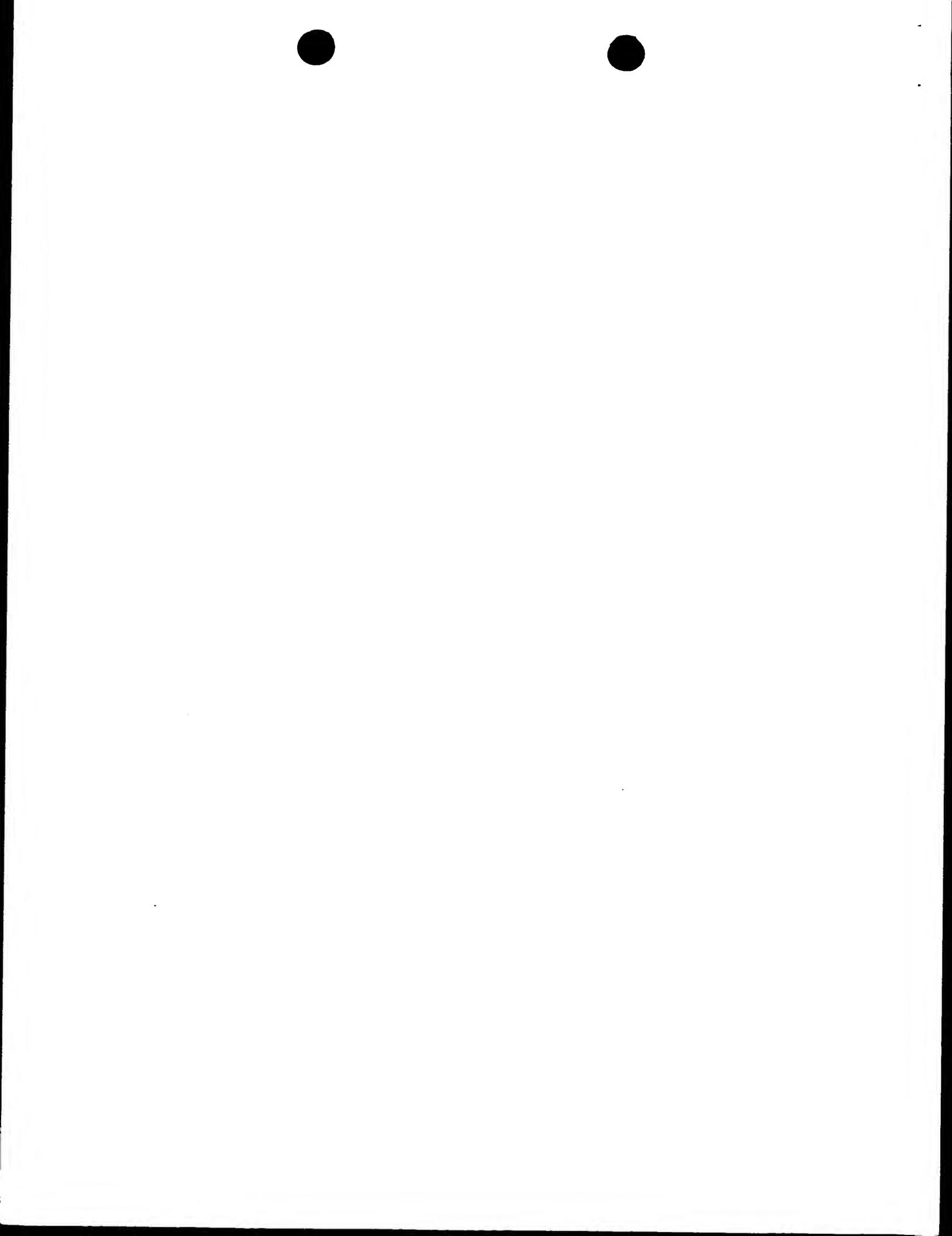
1.1. Die Anmeldung beschreibt die Klonierung einer Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase (ura3) aus *Ashbya gossypii*, sowie deren Verwendung zur Herstellung auxotropher *A. gossypii* Stämme.

1.2. Neuheit und Erfinderische Tätigkeit

Die beanspruchten Nukleinsäuresequenzen sind im zitierten Stand der Technik nicht verzeichnet und daher neu. Das am nächsten verwandte, bekannte Gen aus *Candida glabrata* (Zhou et al., 1994) besitzt ungefähr 68% Sequenzhomologie.

Eine Vielzahl homologer Gene aus einer Vielzahl biotechnisch interessanter Mikroorganismen sowie Verfahren zu ihrer Klonierung sind im Stande der Technik beschrieben (siehe die zitierte Literatur des Recherchenberichts). Deshalb müsste die Klonierung des entsprechenden Gens aus *A. gossypii* und dessen Verwendung zunächst als naheliegend angesehen werden. Da jedoch die Klonierung mittels der dem Fachmann naheliegenden Verfahren zu keinem brauchbaren Resultat führte, und erst aussergewöhnlich aufwendige Methoden zum Ziel führten, kann für die beanspruchten Sequenzen aus *A. gossypii* (Seq. ID no. 1) ein erfinderisches Element bejaht werden.

Die auf das Gen und dessen Verwendung gerichteten Ansprüche werden daher für erfinderisch gehalten.

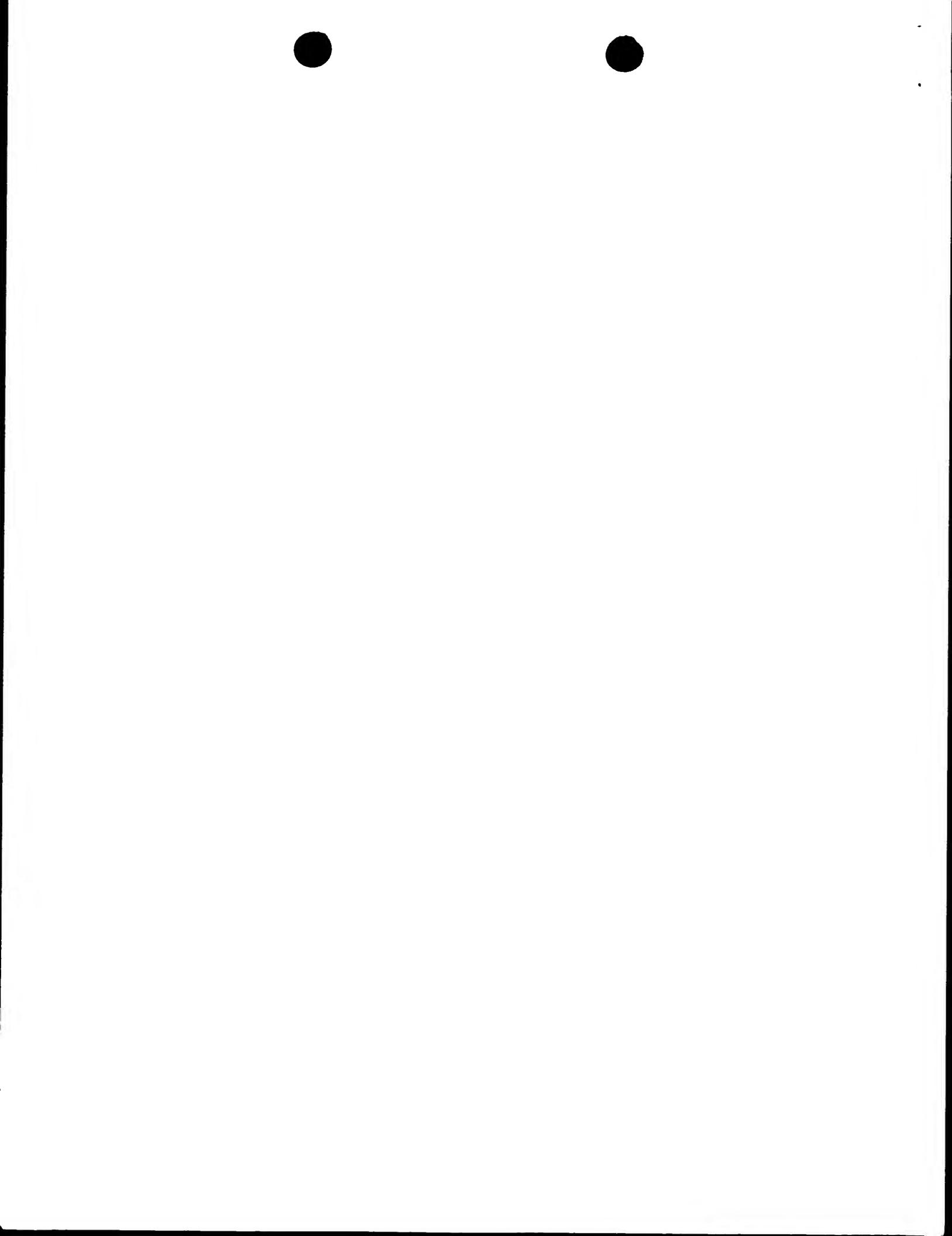


5555, 68175

Patentansprüche

1. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen.
- 5 2. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen oder seine Homologen aus *Ashbya gossypii* stammt.
- 10 3. Aminosäuresequenzen codiert durch ein Gen oder seine Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2.
- 15 4. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
5. Genkonstrukt enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Gen oder seine Homologen funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 20 6. Genkonstrukt nach Anspruch 5, deren Genexpression durch die Regulationssignale erhöht wird.
7. Vector enthaltend ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 5 oder 6.
8. Mikroorganismus enthaltend mindestens ein Genkonstrukt gemäß 30 Anspruch 5 oder 6.
9. Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiv ist, und daß man dieses veränderte Gen in die Mikroorganismen einführt und über homologe Rekombination in das Genom der Organismen integriert und anschließend diese Mikroorganismen auf 5-Fluororotsäureresistenz selektioniert.
- 35 40 10. Verfahren zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienten Mikroorganismus einen Vector einbringt, der ein intaktes Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 zusammen mit mindestens einem weiteren Gen

GEÄNDERTES BLATT



enthält, und diesen Mikroorganismus auf oder in einem Kulturmedium ohne Uracil anzieht.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Vector eine lineare DNA verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienter Mikroorganismus ein *Ashbya gossypii* Stamm verwendet wird.
- 10 13. Verfahren nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavin synthese in den Mikroorganismus eingebracht wird.
- 15 14. Verwendung einer Gen-Sequenz oder seiner Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 als Selektionsmarker.
15. Verwendung nach Anspruch 14 in *Ashbya gossypii*.

20

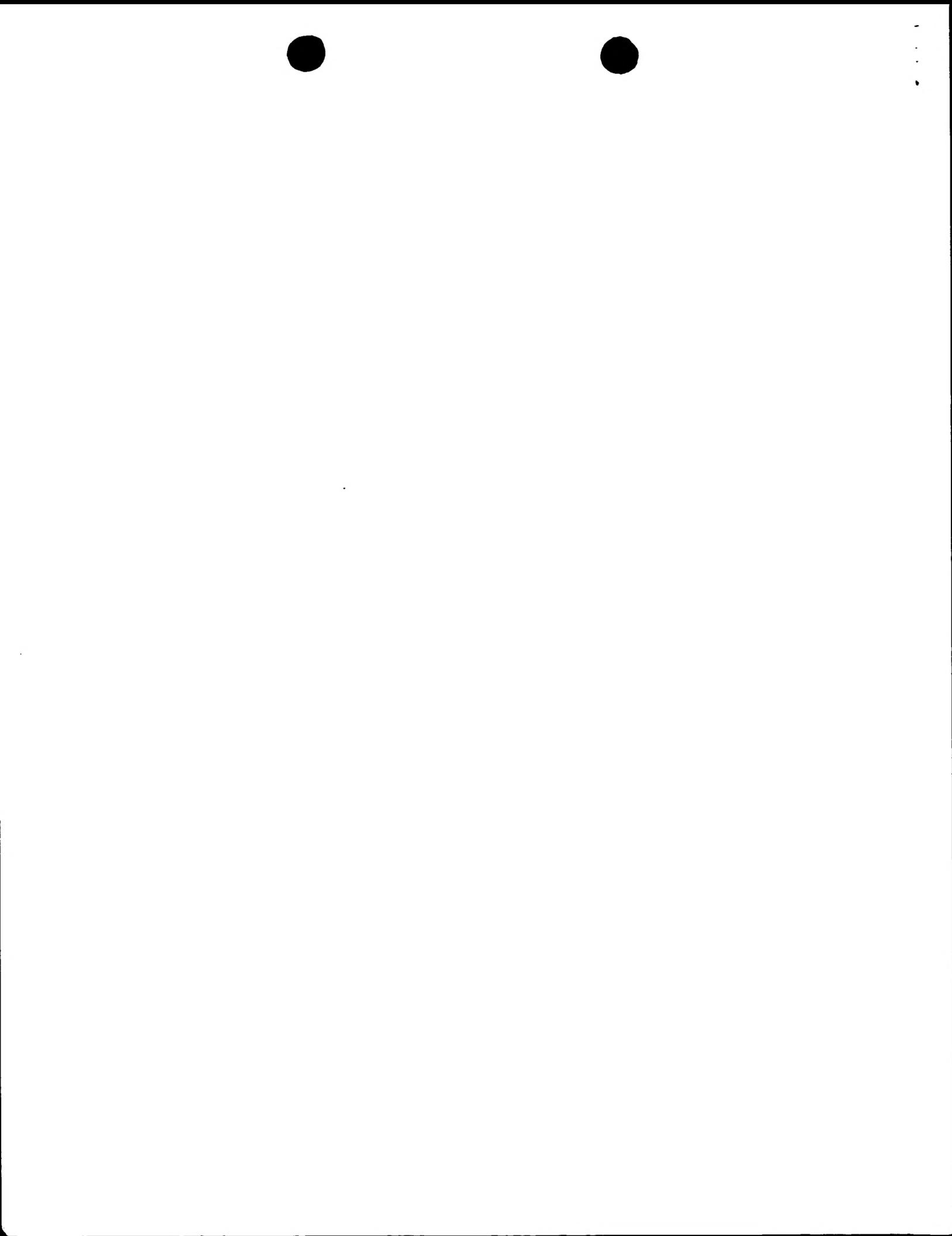
25

30

35

40

45



105

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

09/582,779  
Paper # 3 Attach  
(IDS)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>0050/048715</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 98/ 08382</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>18/12/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>15/01/1998</b>
Anmelder <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3.  **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

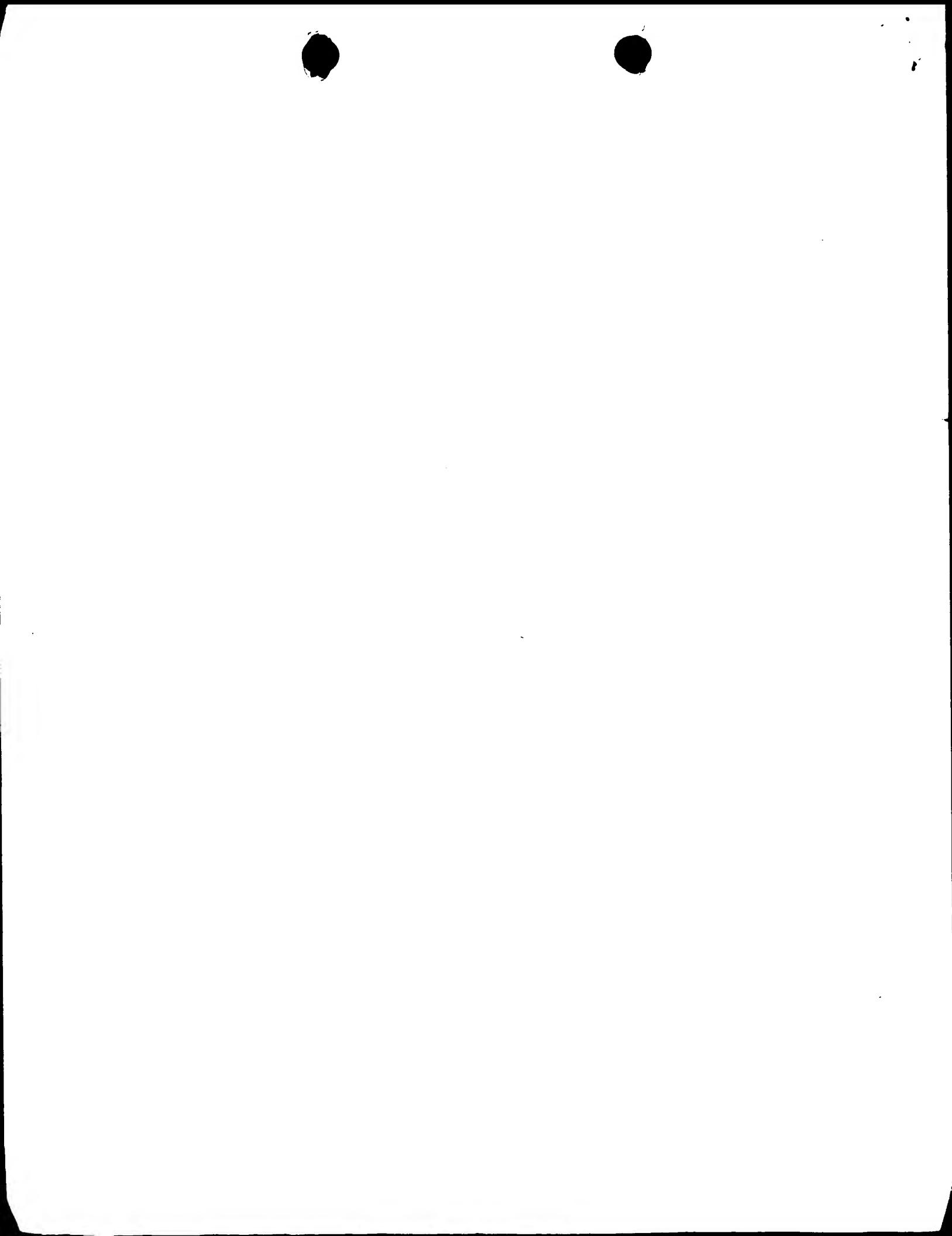
**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_**

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

1/EP 98/08382

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/52 C07K14/37

C12P25/00

C12N15/80

C12N9/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>9</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5. Oktober 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiel 1 ---	1-5
Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, Bd. 29, 1. Januar 1984, Seiten 113-124, XP002092104 in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 5 --- -/-	1-5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29. Juni 1999

12/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 215, 5. Oktober 1990, Seiten 403-410, XP000604562 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28. Mai 1980 siehe Abbildung 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast <i>Candida glabrata</i> " GENE, Bd. 142, 1994, Seiten 135-140, XP002106569 siehe Abbildung 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in <i>Aspergillus fumigatus</i> using the orotidine-5'-decarboxylase gene, <i>pyrG</i> , as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, Bd. 30 (1), 1996, Seite 76-82 XP002107254 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of <i>Mucor circinelloides</i> OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , Bd. 248 (2), 1995, Seite 126-135 XP002107255 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast <i>Yamadazyma (Pichia) ohmeri</i> " YEAST , Bd. 10, Nr. 12, 1994, Seiten 1601-1612, XP002107256 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,4,6-9, 12
		-/-



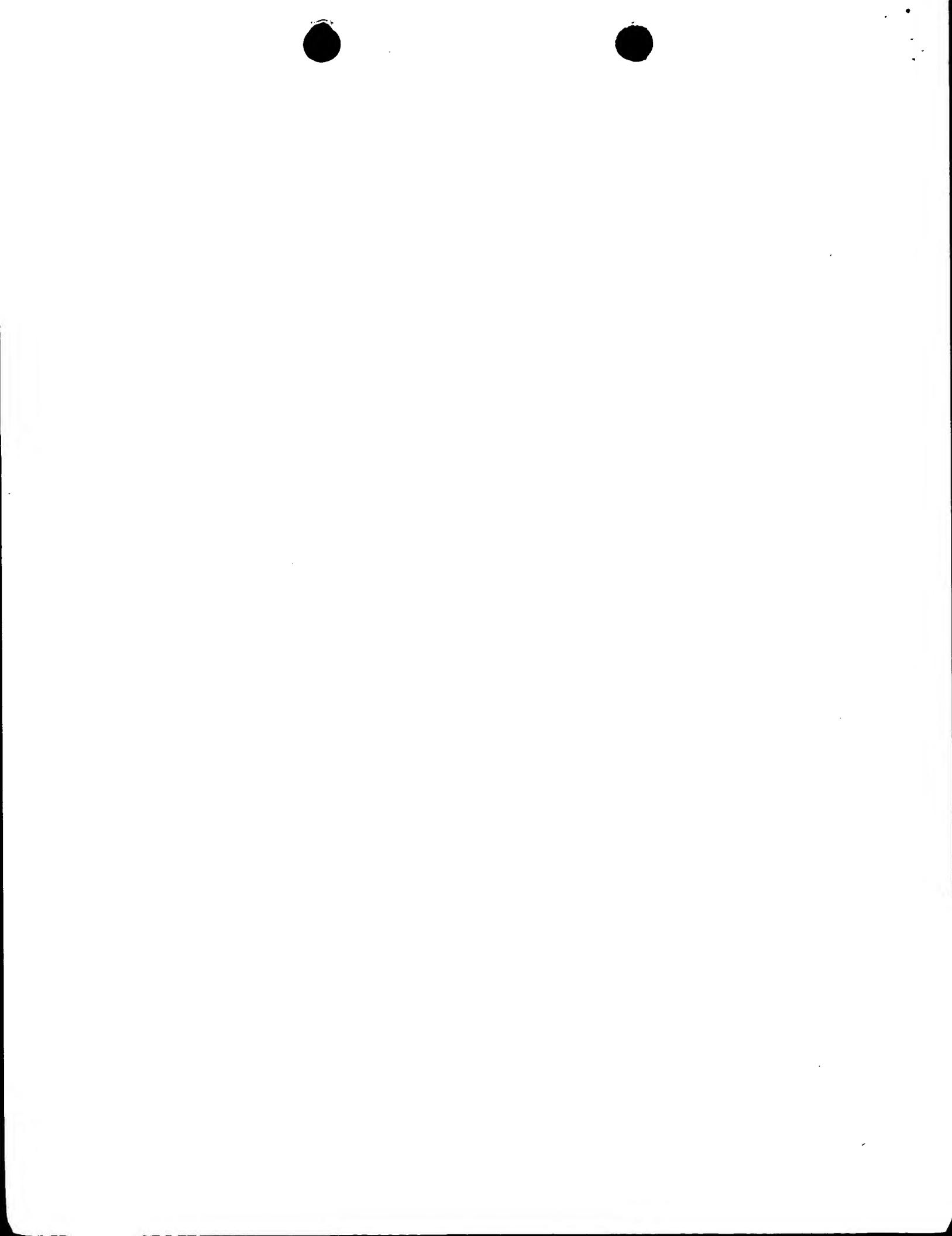
## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08382

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556" YEAST, Bd. 9, Nr. 6, 1993, Seiten 677-681, XP002107257 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1, 4, 8-10, 14



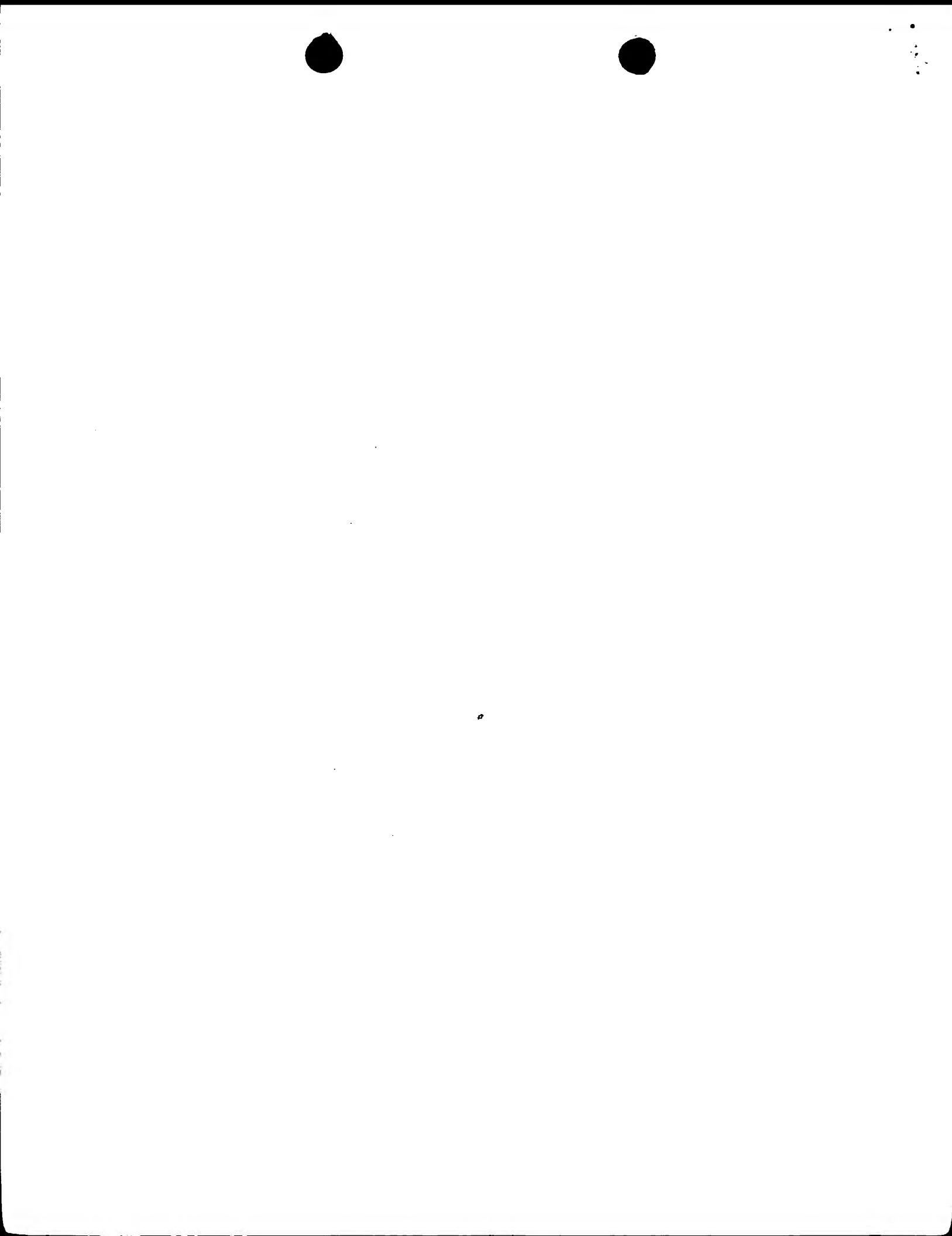
## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
DE 4420785	A 05-10-1995	CA	2186403	A	05-10-1995
		CN	1146781	A	02-04-1997
		WO	9526406	A	05-10-1995
		EP	0751995	A	08-01-1997
		JP	9510618	T	28-10-1997
		US	5821090	A	13-10-1998
WO 9703208	A 30-01-1997	DE	19525281	C	04-04-1996
		DE	19545468	A	21-08-1997
		CA	2223877	A	30-01-1997
		CN	1193356	A	16-09-1998
		EP	0839211	A	06-05-1998
EP 0011562	A 28-05-1980	FR	2441659	A	13-06-1980
		JP	55077889	A	12-06-1980
		US	4387162	A	07-06-1983



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C07K 14/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/36432</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08382		(81) Bestimmungsstaaten: CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98)			
(30) Prioritätsdaten: 198 01 120.2 15. Januar 1998 (15.01.98) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POMPEJUS, Markus [DE/DE]; Lerchenstrasse 72, D-67165 Waldsee (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo, 11, 4E, E-37001 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; Versalles, 7, E-37009 Salamanca (ES).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: OROTIDINE 5'-PHOSPHATE DECARBOXYLASE-GENE, GENE CONSTRUCT CONTAINING SAID GENE AND THE UTILIZATION THEREOF			
(54) Bezeichnung: OROTIDIN-5'-PHOSPHATDECARBOXYLASE-GEN, GENKONSTRUKT ENTHALTEND DIESES GEN UND SEINE VERWENDUNG			
(57) Abstract			
The invention relates to an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof, a gene construct containing said gene or the homologues thereof and the utilization of the same. The invention also relates to vectors or organisms containing an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof. In addition, the invention relates to a method for producing uracil auxotrophic microorganisms and to a method for introducing DNA in uracil auxotrophic microorganisms.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen Verwendung. Die Erfindung betrifft ausserdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen, Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen 10 Verwendung. Die Erfindung betrifft außerdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung 15 von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.

Vitamin B2, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier 20 essentiell. Bei Vitamin B2-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten und ähnliche Hautschäden, Bindegautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme 25 auftreten. Vitamin B2 hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminzusatz bei Vitaminmangel und als Futtermittelzusatz. Daneben wird es als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc. eingesetzt.

Die Herstellung von Vitamin B2 erfolgt entweder chemisch oder 30 mikrobiell (siehe z.B. Kurth et al., 1996, Riboflavin, in: Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, VCH Weinheim). Bei den chemischen Herstellverfahren wird Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte, wie z.B. D-Ribose, eingesetzt werden müssen. Eine Alternative zur chemischen Synthese 35 von Riboflavin ist die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als Ausgangsstoffe dienen dabei nachwachsende Rohstoffe, wie Zucker oder pflanzliche Öle. Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et 40 al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983), aber auch Hefen, wie z.B. *Candida*, *Pichia* und *Saccharomyces* oder Bakterien, wie z.B. *Bacillus*, *Clostridien* oder *Corynebakterien* sind als Riboflavin-Produzenten beschrieben.

In der DE 44 20 785 wurden sechs Riboflavin-Biosynthesegene aus *Ashbya gossypii* beschrieben, sowie Mikroorganismen, die mit diesen Genen transformiert wurden und die Verwendung solcher Mikroorganismen zur Riboflavinsynthese.

5 Bisher werden Gene über die Marker *leu2* (Leucin-Auxotrophie), *thr4* (Threonin-Auxotrophie) oder *kan* (Kanamycin-Resistenz) in pilzliche Riboflavinproduzenten wie *Ashbya gossypii* eingebracht (WO 92/00379). In Hefen wird als weiterer Marker *met15* (Methionin-Auxotrophie, Cost et al., Yeast, Vol. 12, 1996: 939 - 10 941) beschrieben. Von Nachteil bei diesen Marker ist, daß entweder die Transformationseffizienz sehr gering ist und/oder aber zur Selektion ständig Antibiotika gegeben werden muß. In jedem Fall ist jedoch eine Gegenselektion auf den Verlust des Markers unter Erhalt der eingebrachten Gene im Mikroorganismen nicht oder 15 nur unter einem sehr hohen Aufwand möglich, so daß weitere Gene mit diesen Markern in der Regel nicht mehr in die Mikroorganismen eingebracht werden können. Es ist deshalb wünschenswert einen Selektionsmarker, der eine hohe Transformationseffizienz aufweist, leicht selektionierbar ist und eine Gegenselektion ermöglicht, zu haben.

20 Das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= URA3-Gen) aus *Saccharomyces cerevisiae* ist einer der klassischen Marker, der die gewünschten Eigenschaften besitzt und mit dessen Hilfe Gene in Mikroorganismen wie Hefen und Pilze transformiert werden können. In einer Reihe von Arbeiten wird die Isolierung art-spezifischer URA3-Gene bzw. die Isolierung des entsprechenden Gens aus Pilzen (= *pyrG*) sowie deren Sequenzen aus *Pichia stipitis*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yamadazyma ohmeri*, *Candida maltosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, 25 *Aspergillus nidulans*, *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Penicillium chrysogenum*, und *Aspergillus awamori* beschrieben (Appl. Environ. Microbiol., Vol. 60, No. 12, 1994 : 4245 - 4254, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183, J. Ferment. Bioeng., Vol. 73, No 4, 1992: 255 - 260, Yeast, 30 Vol. 9, 1993: 677 - 681, Yeast, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Curr. Genet., Vol. 23, 1993: 205 - 210, Nucl. Acids Res., Vol. 16, No. 5, 1988: 2339, Curr. Genet., Vol. 16, 1989: 159 - 163, Gene, Vol. 61, 1987: 385 - 399, Gene, Vol. 116, 1992: 59- 67, Mol. Gen. Genet., Vol. 224, 1990: 269 - 278, Nucl. Acids Res., Vol. 16, 35 No. 16, 1988: 8177, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183 und Curr. Genet., Vol. 27, 1995: 536 - 540).

Arbeiten von Rose et al. (Gene, Vol. 29, 1984: 113 - 124) 40 zeigten, daß das URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* sogar eine entsprechende Mutation (*pyrF*-Gen = URA3) in Prokaryonten wie *Escherichia coli* komplementieren kann und als Selektionsmarker sinnvoll verwendet werden kann.

Bei genetischen Arbeiten zur Riboflavinsynthese von *Ashbya gossypii* (Vitamin B2-Synthese) zeigte sich jedoch, daß das URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder das pyrF-Gen aus *Escherichia coli* keine Uracil auxotrophen *Ashbya gossypii*-Mutanten 5 komplementieren können und deshalb diese Gene zur Klonierung von Genen in *Ashbya gossypii* nicht verwendet werden kann.

Es wurde deshalb versucht, daß dem URA3-Gen oder pyrF-Gen entsprechende Gen aus *Ashbya gossypii* unbekannt ist, dies zu 10 klonieren. Versuche zur Klonierung des *Ashbya*-Gens nach den in der Literatur beschriebenen Methoden über beispielsweise Hybridisierung mit URA3-Gen-Fragmenten oder über degenerierte Oligonukleotide auf Basis konservierter Aminosäuresequenzen verschiedener Orotidin-5'-phosphatdecarboxylasen und Screening einer 15 "cDNA-library" mit diesen Oligonukleotiden und der PCR-Technik waren erfolglos (Bergkamp et al., Yeast, Vol. 9, 1993: 677 - 681, Piredda et al., Yeast, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Benito et al., Gene, Vol. 116, 1992: 59 - 67 und Diaz-Minguez et al., Mol. Gen. Genet., Vol. 224, 1990: 269 - 278).

20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, deshalb einen leicht selektionierbaren, mit hoher Ausbeute transformierbaren und einfach gegenselektionierbaren Marker zur Verfügung zu stellen, der das Einbringen von Genen in Mikroorganismen ermöglicht.

25 Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen, gelöst.

30 Unter Homologe des erfindungsgemäßen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 80 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 90 % Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 % Homologie auf-

35 weisen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 1 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der

40 abgeleiteten synthetisierten Proteine vorteilhafterweise für das Einbringen eines oder mehrerer Gene jedoch erhalten bleiben sollte. Sollen mit Hilfe der SEQ ID NO: 1 und seiner Homologen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen jedoch Mutanten im Orotidin-5'-Phosphat-

45 decarboxylase-Gen hergestellt werden, so werden nicht funktionelle Gene das heißt Gene, die zu enzymatisch inaktiven Proteinen führen, verwendet. Dabei werden vorteilhafterweise Sequenzen ver-

wendet, die Homologien zur SEQ ID NO: 1 oder seinen Homologen vorteilhaft am 3'- und 5'-Ende aufweisen.

Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise 5 pilzliche oder pflanzliche Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt von mindestens 70 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, ganz 10 besonders bevorzugt von mindestens 90 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die 15 den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschalten sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz 20 in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon 25 so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert bevorzugt erhöht wird.

Bevorzugt läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Mikroorganismen der Familie Metschnikowiaceae, besonders bevor 30 zugt aus Mikroorganismen der Gattungen Eremothecium, Ashbya oder Nematospora, ganz besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattung und Art Eremothecium ashbyii oder Ashbya gossypii isolieren.

35 Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die URA3-Gensequenzen SEQ ID No. 1 und seine Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen 40 um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die 45 natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale

vor die Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die URA3-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein, wobei das oder die Gene auch inaktiviert sein können. Mit Hilfe dieses oder dieser inaktivierten Gene können im erfindungsgemäßen Verfahren Uracil-auxotrophe Mutanten erzeugt werden. Zum Einbringen weiterer Gene in einen Mikroorganismus sind im Genkonstrukt vorteilhafterweise weitere Gene enthalten. Diese Gene können innerhalb eines URA3-Genes liegen, wobei vorteilhaft eine intakte Kopie des URA3-Gens und/oder ein anderes selektierbares Gen wie leu2, thr4 oder kan im Konstrukt enthalten sein sollte, oder sie können außerhalb des URA3-Genes liegen. Auch im Falle eines intakten URA3-Gens im Genkonstrukt können noch weitere Marker wie die oben genannten gegebenenfalls zur Selektion im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>q</sup>-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-<sub>PR</sub>- oder im λ-<sub>PL</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF<sub>α</sub>, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Genkonstrukt können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Mikroorganismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können innerhalb oder außerhalb der Markergene wie ura3, leu2, thr4 oder kan inseriert sein. Prinzipiell können

alle Arten von Genen mit Hilfe des erfindungsgemäßen URA3-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen in Mikroorganismen eingebracht werden. Vorteilhafterweise lassen sich regulatorische Gene wie Gene für Induktoren, Repressoren oder 5 Enzyme, die über ihre enzymatische Aktivität in die Regulation eingreifen, oder ein oder mehrere oder alle Gene eines Biosyntheseweges wie die Gene der Riboflavinbiosynthese wie beispielsweise die rib-Gene oder Gene von Biosynthesewegen, die zu anderen Feinchemikalien, Sekundärmetaboliten oder Proteinen 10 führen wie die Gene der Biotin-, Lysin-, Methionin-, Vitamin B12- oder Carotinoidbiosynthese, oder Gene, die zu Aroma-, Wuchs- oder Geruchsstoffen führen oder einzelne Gene für Enzyme wie Proteasen oder Lipasen über die URA3-Sequenz in Wirtsorganismen einbringen und exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen 15 Ursprungs sein. Die eingebrachten Gene können einen eigenen Promotor haben oder aber unter der Regulation des Promotors der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seiner Homologen liegen.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise 20 einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, 25 PUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, λgt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2μM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. 30 Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

35 Vorteilhafterweise enthält das Genkonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminalen regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

40 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es 45 sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

10 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem 15 linearisierten Plasmid oder nur aus dem Genkonstrukt als Vektor bestehen.

Als Wirtsorganismen für das erfindungsgemäße Genkonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen 20 in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen, tierische oder pflanzliche Zellen verwendet. Bevorzugt werden Pilze oder Hefen, besonders bevorzugt Pilze, ganz besonders bevorzugt Pilze der Familie 25 Metschnikowiaceae wie Eremothecium, Ashbya oder Nematospora verwendet.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen. Zur Erzeugung von Uracil auxotrophen Mutanten wird das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-30 Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen beispielsweise durch Mutagenese so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiviert wird. Dieses inaktivierte Gen wird anschließend in einen Mikroorganismus beispielsweise über Transformation oder Elektroporation eingeführt. Durch homologe Rekombination in 35 den Mikroorganismen entstehen schließlich auxotrophe Mutanten, die über ihre Resistenz gegen 5-Fluororotsäure gescreent werden können (siehe Boeke et al., Mol. Gen. Genet., Vol. 197, 1984: 345 - 346).

40 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= URA3-Gen) defizienten Organismus bevorzugt einen Mikroorganismus einen Vektor einbringt, der ein intaktes URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen vorteilhafterweise zusammen mit weiterer DNA 45 vorzugsweise mit mindestens einem weiteren Gen enthält, und diesen Organismus auf oder in einem Kulturmedium kultiviert, das kein Uracil enthält. In diesem Medium können nur diese Organismen

wachsen, die den Vektor erhalten haben. Bevorzugt wird in diesem Verfahren als Vektor eine lineare DNA verwendet. Als Mikroorganismen werden in diesem Verfahren bevorzugt Pilze besonders der Familie Metschnikowiaceae wie Eremothecium, Ashbya oder 5 Nematosprora, besonders bevorzugt Mikroorganismen der Gattung Ashbya verwendet.

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid (insbesondere aber ein Plasmid, das den Replikationsursprung des 2m Plasmids aus S. 10 cerevisiae trägt) verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al., 15 Genetics, Vol. 140, 1995: 973 - 987).

Das erfindungsgemäße URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen lassen sich vorteilhaft als Selektionsmarker im erfindungsgemäßen Verfahren verwenden. Bevorzugt lassen sich Gene 20 unter Verwendung dieses Selektionsmarkers Gene in Ashbya gossypii einbringen.

Von Vorteil ist weiterhin, daß man bei der Transformation von Ashbya gossypii mit Hilfe dieses Genes selektionieren kann, ohne 25 Fremd-DNA (d.h. DNA, die nicht aus Ashbya gossypii stammt) verwenden zu müssen.

Bei der Transformation von Ashbya gossypii mit dem Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen können beliebige weitere Gene 30 miteingebracht werden. Dadurch ist es möglich, Stämme zu konstruieren, die einzelne Gene oder mehrere Gene in weiteren Kopien entweder auf Plasmiden oder im Genom tragen.

Des weiteren ist es möglich, Ashbya-Stämme zu konstruieren, bei 35 denen chromosomal Kopien von Genen durch die Insertion des URA3 Gens mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen zerstört wurden.

Ein besonderer Vorteil des AgURA3 Gens ist die Möglichkeit, den Marker mehrfach hintereinander im gleichen Stamm zu verwenden. 40 Wenn man 5' und 3' des Gens identische Nukleotidsequenzen in gleicher Orientierung (sogenannte direct repeats) setzt, kann man den AgURA3 Marker bei Bedarf durch Homologe Rekombination und Selektion auf Uracil- und FOA-haltigen Medium wieder entfernen und dann in einer weiteren Runde zusätzliche DNA mit Hilfe dieses 45 Gens einbringen. Ein weiterer Vorteil ist die deutlich höhere Transformationseffizienz im Vergleich zu den Markern thr, leu oder kan.

Im erfindungsgemäßen Verfahren enthält der Vektor als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavinsynthese. Unter Gene der Riboflavinsynthese sind solche Gene zu verstehen, die an der Synthese im gesamten Stoffwechsel von Riboflavinproduzenten wie 5 *Ashbya* beteiligt sind.

Beispiele:

Beispiel 1:

10

Herstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*  
ATCC10895

Genomische DNA aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde nach dem in 15 WO97/03208 beschriebenen Verfahren präpariert. Die genomische Genbank, ausgehend von dieser DNA, wurde nach der in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschriebenen Me- 20 thode in pRS314 und in YEp351 (Hill et al., Yeast, Vol. 2, 1986: 163 - 167) erstellt. Wie beispielsweise WO97/03208 zu entnehmen ist, sind auch andere Plasmide wie Plasmide der pRS-Reihe 25 (Sikorski und Hieter, Genetics, 1989: 19-27) oder Cosmiden, wie z.B. SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, USA) für die Herstellung der Genbank geeignet.

Beispiel 2:

Es wurde zunächst versucht das Gen für die Orotidin-5'-Phosphat- 30 decarboxylase (= OMP-DC) aus *Ashbya gossypii* über eine funktionelle Komplementation einer entsprechenden URA3 auxotrophen Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren.

Dazu wurde eine Genbank von genomischer *Ashbya gossypii* DNA in 35 pRS314 erstellt (wie in Beispiel 1 beschrieben). Mit dieser DNA wurde der *S. cerevisiae* Stamm MW3317-21A (Genotyp: MAT  $\alpha$ , *trp1*, *ade8\Delta Kpn*, *ura3-52*, *hom3-10*, *met13*, *met4*, *ade2*, *his3-Kpn*, siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell. Biol. 9, 1989: 4432-4440), nach der Lithiumacetat-Methode (siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell. 40 Biol. 9, 1989: 4432-4440) transformiert. Es wurde kein Klon erhalten, bei dem die genomische Deletion des *ura3* Gens des *S. cerevisiae*- Stammes durch ein Genfragment aus *Ashbya* komplementiert wurde.

10

Auch der Versuch über eine funktionelle Komplementation in einer *pyrF*-Mutante von *E. coli* das *URA3* Gen von *Ashbya gossypii* zu klonieren schlug fehl.

5 Beispiel 3:

Auch ein Versuch, das OMP-DC-Gen aus *Ashbya gossypii* über Hybridisierung mit einem Fragment des entsprechenden Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren, gelang nicht.

10

Dazu wurde das komplette *URA3*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank entry *yscodcd*) als Sonde (1,1 kb Länge) verwendet, um eine genomische Cosmid-Genbank von *Ashbya gossypii* (siehe Beispiel 1) zu screenen. Der Versuch wurde wie in Sambrook, J. et 15 al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons beschrieben durchgeführt, wobei Hybridisierungstemperaturen von 52°C bis 68°C verwendet wurden. Es konnten keine Klone in der Genbank identifiziert werden, die ein positives Signal mit dem *URA3*-Gen aus 20 *S. cerevisiae* als Sonde lieferten.

Beispiel 4:

25 Im nächsten Ansatz wurde die Klonierung des Gens für OMP-DC aus *Ashbya gossypii* über Amplifikation von Genfragmenten mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden und der PCR-Technik versucht.

Für diesen Versuch wurden die bekannten Aminosäuresequenzen der 30 verschiedenen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylasen aus den folgenden Organismen miteinander verglichen und Bereiche ausgewählt, die in allen Enzymen höchstmöglich konserviert sind:

Aspergillus niger (Acc. number: P07817)  
35 Aspergillus nidulans (Acc. number: P10652)  
Schizosaccharomyces pombe (Acc. number: P14965)  
Penicillium chrysogenum (Acc. number: P09463)  
Kluyveromyces lactis (Acc. number: P07922)  
Candida albicans (Acc. number: P13649)  
40 Neurospora crassa (Acc. number: P05035)  
Ustilago maydis (Acc. number: P15188)  
Saccharomyces cerevisiae (Acc. number: P03962)  
Drosophila melanogaster (Acc. number: Q01637)  
Mouse (Acc. number: P13439)  
45 Human (Acc. number: P11172)

11

Die in den Klammer angegebenen Nummern stammen aus der SWISS&PIR-  
Translated Datenbank Release 103.

Auf Basis dieser Informationen wurden degenerierte Oligonukleotide  
5 synthetisiert.

Unter degenerierten Oligonukleotiden versteht man Oligo-  
nukleotide, bei denen während der Synthese an mehreren Positionen  
Mischungen von Nukleotiden eingebaut wurden.

10

R steht dabei für G oder A, Y steht dabei für C oder T, W steht  
dabei für A oder T, M steht dabei für A oder C, K steht dabei für  
G oder T, S steht dabei für C oder G, H steht dabei für A, C oder  
T, V steht dabei für A, C oder G, B steht dabei für C, G oder T,  
15 D steht dabei für A, G oder T, N steht dabei für G,A,T oder C.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

UR A3-A: 5'-YTNGGNCCNTAYATHGY-3'  
20 URA3-B: 5'-TAYTGYTGNCCNARYTTRTCNCC-3`  
UR A3-C: 5'-TTYYTNATHTTYGARGAYMGNAARTT-3'  
UR A3-D: 5'-GCNARNARNARNARNCCNC-3'

Mit diesen Oligonukleotiden als Primer wurden PCR Reaktionen  
25 durchgeführt mit genomischer DNA von *Ashbya gossypii* als Matrize  
verwendet.

Es wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

30 URA3-A + URA3-B; URA3-A + URA3-D; URA3C + URA3-B and URA3-C +  
URA3-D.

Folgende Hybridisierungstemperaturen wurden verwendet:

35 52 °C, 48 °C, 44 °C, 40 °C und 37 °C.

Die aus den PCR-Reaktionen entstandenen Produkte wurden nach  
üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega) kloniert und  
sequenziert. Es konnten keine Fragmente amplifiziert werden, die  
40 Homologie zu bekannten oben genannten OMP-DC Genen zeigten.

Beispiel 5:

Wie in DE 44 20 785 A1 (Beispiel 1) beschrieben wurden eine cDNA-  
45 Bank von *Ashbya gossypii* erstellt.

## Beispiel 6:

## Analyse von Nukleinsäuresequenzen der Genbank

5 Von *E.coli* Klonen, die die in Beispiel 5 beschriebene Genbank von *Ashbya gossypii* enthalten, wurden Einzelklone selektiert. Nach üblichen Methoden wurden die Zellen in geeigneten Medien (z.B. Luria-Broth mit 100 mg/l Ampicillin) kultiviert und Plasmid-DNA aus diesen Zellen isoliert.

10

Es wurde Oligonukleotide, die im Vektoranteil hybridisieren als Primer für die Sequenzierung der cDNA Klonen verwendet. Dabei wurden Fragmente der klonierten cDNAs erfasst. Die Sequenzen wurden wie in Beispiel 7 beschrieben analysiert.

15

## Beispiel 7:

Es wurde eine Computer-unterstützte Analyse der gefundenen Nukleotidsequenzen über Sequenzvergleiche neu identifizierter

20 Sequenzen mit bestehenden DNA und Proteindatenbanken mit Hilfe folgender Algorithmen z.B. mit BLAST Algorithmen (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), dem Clustal Algorithmus mit Hilfe der PAM250 Gewichtungstabelle oder dem Wilbur-Lipman DNA alignment Algorithmus (wie z.B. in dem Programmpaket MegAlign 25 3.06 der Firma DNASTAR implementiert) durchgeführt. Auf diesem Weg konnten Ähnlichkeiten der neu entdeckten Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen entdeckt und neue Gene oder Teilesequenzen von Genen in ihrer Funktion beschrieben werden.

30 Beispiel 8:

Identifikation von *E. coli* Klonen, die das Gen für OMP-DC aus *Ashbya gossypii* (AgURA3) tragen.

35 Nach Untersuchung einer Vielzahl von Klonen wie in Bsp. 6 und 7 (> 100 Klone) beschrieben wurde eine Sequenz gefunden, die Ähnlichkeiten zu den bekannten OMP-DC Genen zeigte. Mit dieser homologen Sonde wurde dann die genomische *Ashbya* Genbank (siehe Beispiel 1) nochmals gescreent und es konnten Klone bzw. Cosmide 40 identifiziert werden, die ein spezifisches positives Signal ergeben und ein gemeinsames 1,3 kb XhoI-EcoRI-Fragment trugen. Die Sequenzierung der Klone ergab die Sequenz wie in SEQ ID NO: 1 beschrieben. Die Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu bekannten URA3 Genen und codiert für ein ca. 29246 Dalton großes Protein.

45

## Beispiel 9:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens mit Antibiotika-Resistenzgenen

5

Unter Disruption eines Genes versteht man die Zerstörung der Funktionalität einer genomischen Kopie des Gens entweder durch (a) Entfernen eines Teiles der Gensequenz, oder durch (b) der Unterbrechung des Gens durch Einfügung eines Stückes Fremd-DNA in 10 das Gen oder durch (c) Ersatz eines Teils des Gens durch Fremd-DNA. Die verwendete Fremd-DNA ist beliebig, bevorzugt aber ein Gen, das Resistenz gegen eine beliebige Chemikalie bewirkt. Zur Disruption von Genen können beliebige Resistenzgene verwendet werden.

15

Zur Disruption des AgURA3-Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus Tn903, das unter Kontrolle des TEF-Promotors von *Ashbya gossypii* (siehe Yeast 10, S. 1793-1808, 1994 oder WO92/00379) verwendet. Das Gen ist 5' 20 und 3' von mehreren Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen flankiert, so daß eine Kassette aufgebaut werden konnte, die beliebige Konstruktionen von Gen-Disruptionen mit üblichen Methoden der *in vitro* Manipulation von DNA ermöglichen.

25 Das interne 370 bp *PstI*-*KpnI* Fragment von AgURA3 (Position 442 - 892 in der Sequenz SEQ ID NO: 1) wurde durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzt. Das erhaltene Konstrukt erhielt den Namen *ura3::G418*. Das erhaltene Plasmid läßt sich nach Transformation in *E.coli* vermehren. Das *XhoI*-*SphI*-Fragment des Konstruktes *ura3::G418* (siehe Figur 1) wurde über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution der DNA aus dem Gel (siehe Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619, 1979) aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt. Figur 1 zeigt in Abbildung A eine Restriktionskarte des kodierenden Bereichs 30 des AgURA3-Gens und der 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (= 5'-UTR und 3'-UTR). Abbildung B zeigt die Situation nach Insertion der oben beschriebenen Kanamycin-Resistenzkassette (= TEF-kanR).

40 Das Fragment wurde entweder über Protoplastentransformation (Gene 109, 99-105, 1991) oder aber bevorzugt durch Elektroporation (BioRad Gene Pulser, Bedingungen: Küvetten mit Spaltbreite 0,4 mm, 1500V, 25µF, 100Ω) in *Ashbya gossypii* transformiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf G418-haltigem Fest- 45 medium (WO 97/03208).

## 14

Erhaltene G418-resistente Klone wurden mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons) daraufhin untersucht, ob die 5 genomische Kopie des AgURA3 Gens tatsächlich zerstört wurde. Klone, deren AgURA3 Gen zerstört wurde, sind Uracil- auxotroph und resistent gegen 1 mg/ml 5'-Fluoro-Orotsäure (FOA).

## 10 Beispiel 10:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens ohne Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen

15 Ein besonderer Vorteil der Verwendung von URA3 Genen ist die Möglichkeit sowohl auf An- als auch auf Abwesenheit des Genes zu selektionieren. Man kann mit FOA Mikroorganismen screenen, die ein funktionell inaktiviertes URA3 Gen besitzen, und mit Hilfe 20 der Selektion auf Uracil- Prototrophie auf ein funktionell aktives URA3 Gen selektionieren.

Zur Disruption der genomischen Kopie des URA3 Gens wurde einfachheitshalber ein internes Fragment (= PstI-Fragment) des URA3 Gens aus dem kodierenden Bereich des Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 25 deletiert (Position 442 bis 520 in der Sequenz SEQ ID NO: 1). Die Transformation von *Ashbya gossypii* mit diesem deletierten ura3-Fragment wurde wie in Beispiel 10 beschrieben durchgeführt. Anstelle der Deletion von Teilbereichen des Gens können prinzipiell auch alle anderen Methoden zur Inaktivierung des Gens wie 30 Mutationen über Insertionen, Duplikationen, Reversionen, Austausch mehrerer Nukleotide oder Punktmutationen verwendet werden. Punktmutationen sind weniger bevorzugt, da sie leicht revertieren.

35 Die Selektion der Transformanten wurde durch Resistenz gegen FOA durchgeführt. Im Gegensatz zu Wild-Typ-Klonen sind Klone, die eine Disruption des AgURA3 Gens tragen sind resistent gegen 1 mg/ml FOA.

15

## Beispiel 11:

Verwendung des AgURA3 Gens zum Einbringen weiterer DNA in A. gossypii.

5

Das in WO 97/03208 beschriebene Isocitratlyasegen wurde mit Hilfe des Plasmids pAG100, wie in WO 97/03208 (Beispiel 4 und 5) beschrieben, in AgURA3-Disruptionsmutanten A. gossypii (siehe Beispiel 9 und 10) eingebracht, wobei als Selektionsmarker in 10 A. gossypii anstelle der beschriebenen G418-Resistenz das AgURA3 Gen verwendet wurde.

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen.
2. Homologe nach Anspruch 1, deren durch sie codierten Genprodukte funktionell sind.
3. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen oder seine Homologen aus *Ashbya gossypii* stammt.
4. Aminosäuresequenzen codiert durch ein Gen oder seine Homologe gemäß den Ansprüchen 1 bis 3.
5. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
6. Genkonstrukt enthaltend ein Orotidin-5'- Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Gen oder seine Homologen funktionell mit einem oder mehreren Regulationsignalen verknüpft ist.
7. Genkonstrukt nach Anspruch 6, deren Genexpression durch die Regulationssignale erhöht wird.
8. Vector enthaltend ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 6 oder 7.
9. Mikroorganismus enthaltend mindestens ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 6 oder 7.
10. Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiv ist, und daß man dieses veränderte Gen in die Mikroorganismen einführt und über homologe Rekombination in das Genom der Organismen integriert und anschließend diese Mikroorganismen auf 5-Fluororotsäureresistenz selektioniert.
11. Verfahren zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienten Mikroorganismus einen Vector

einbringt, der ein intaktes Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 zusammen mit mindestens einem weiteren Gen enthält, und diesen Mikroorganismus auf oder in einem Kulturmedium ohne Uracil anzieht.

5 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Vector eine lineare DNA verwendet wird.

10 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienter Mikroorganismus ein *Ashbya gossypii* Stamm verwendet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, 15 daß als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavin-synthese in den Mikroorganismus eingebracht wird.

15 16. Verwendung einer Gen-Sequenz oder seiner Homologen gemäß Anspruch 1 bis 3 als Selektionsmarker.

20 16. Verwendung nach Anspruch 15 in *Ashbya gossypii*.

25

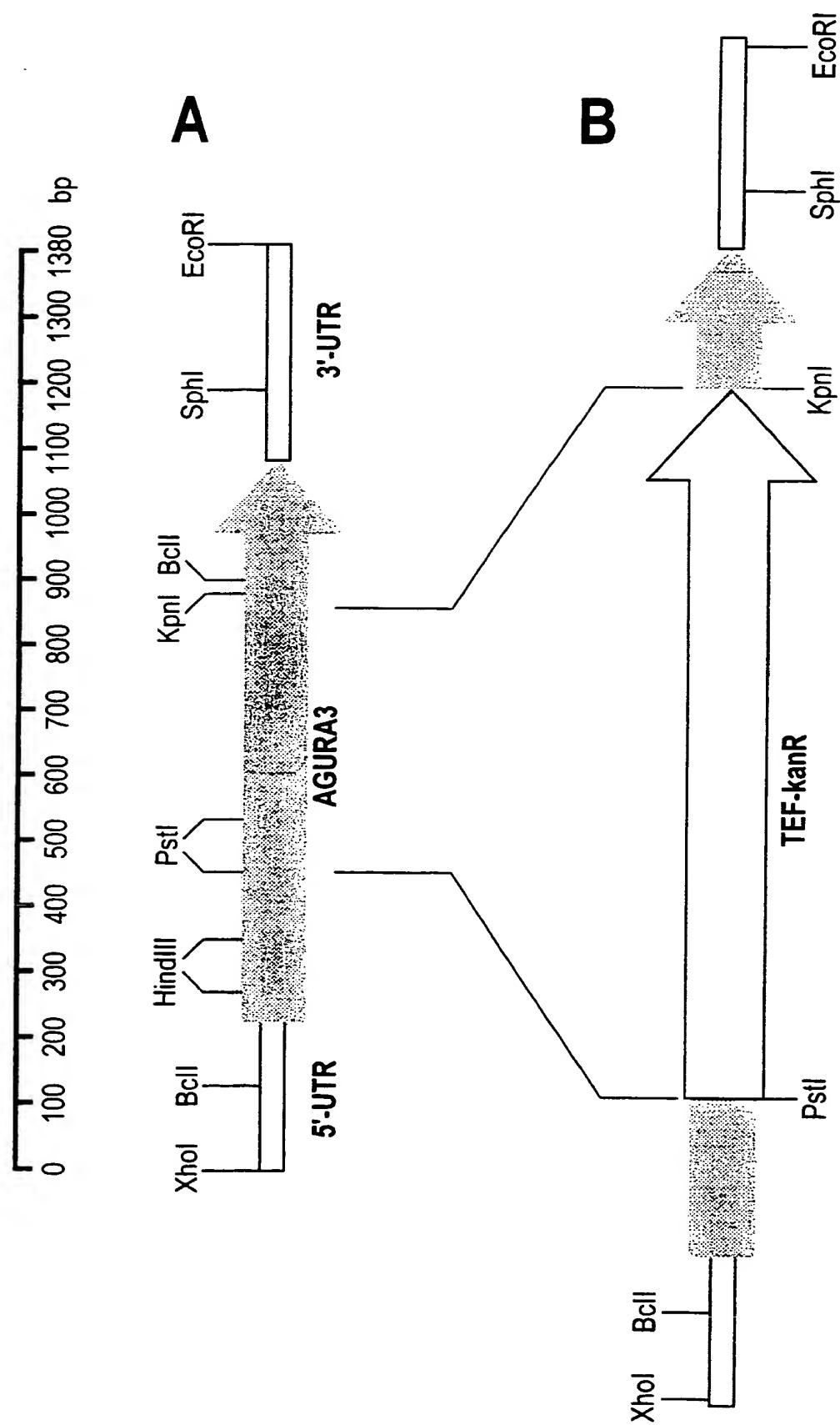
30

35

40

45







## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen,  
Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1380 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

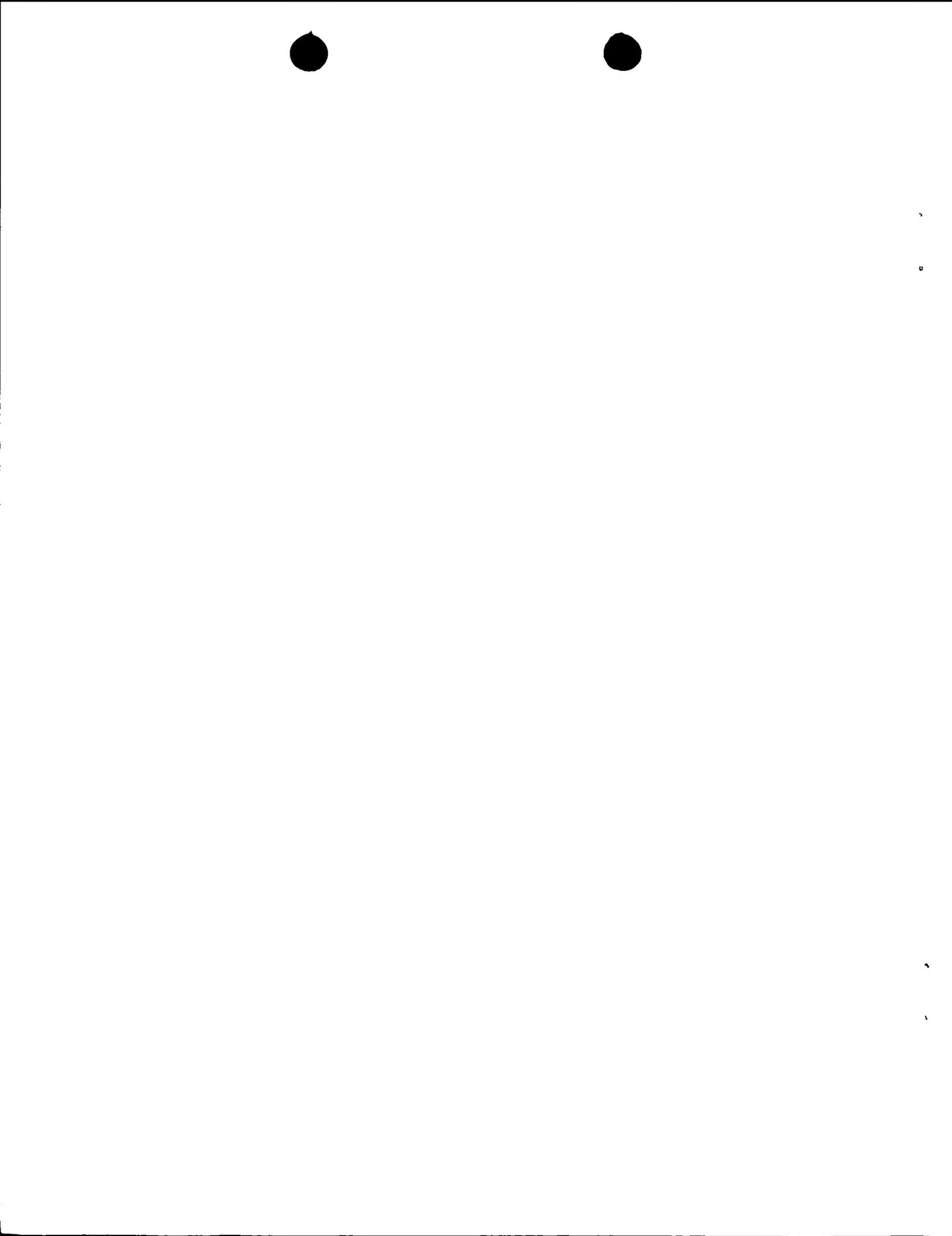
- (B) CLON: *ura3*

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 210..1013

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..199



(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3' UTR  
(B) LAGE: 1014..1380

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTCGAGCAAC	TCATTGGAAG	CCCTTCGCAA	ACGACCTCTA	TATCTCGTCT	CAAGTTCCCTA	60
CTATCATGTA	TGCTGTCACT	ACAGAAAAAT	TTTGTCTAT	AGCTGGCAAG	AAGCACATCA	120
CATACATTCT	GATGGGTGTA	GCTCCACATC	ACAGTAAGCA	TTTGTATAAG	GCTGATCACA	180
TAGGGTGCTA	CCGACCTAGC	CATTGCCAC	ATG TCA ACG AAA TCT TAC GCA GAA			233
			Met Ser Thr Lys Ser Tyr Ala Glu			
			1	5		
AGG GCC AAG GCA CAC AAT TCG CCA GTT GCT AGA AAG CTT CTG GCA TTG						281
Arg Ala Lys Ala His Asn Ser Pro Val Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu						
10	15	20				
ATG CAC GAG AAG AAA ACC AAT CTC TGC GCT TCC CTT GAT GTG CGG ACG						329
Met His Glu Lys Lys Thr Asn Leu Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr						
25	30	35				40
TCT AGA AAG CTT CTG GAG CTA GCA GAC ACG CTG GGA CCG CAC ATT TGT						377
Ser Arg Lys Leu Leu Glu Leu Ala Asp Thr Leu Gly Pro His Ile Cys						
45	50	55				
CTG CTG AAG ACA CAT GTC GAC ATA CTG ACG GAC TTC GAC ATC GAG ACG						425
Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Thr Asp Phe Asp Ile Glu Thr						
60	65	70				
ACA GTC AAG CCG CTG CAG CAG CTT GCG GCT AAG CAC AAC TTC ATG ATC						473
Thr Val Lys Pro Leu Gln Gln Leu Ala Ala Lys His Asn Phe Met Ile						
75	80	85				
TTC GAG GAC CGC AAG TTC GCT GAC ATT GGC AAC ACG GTT AAG CTG CAG						521
Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln						
90	95	100				
TAC TCC TCC GGC GTG TAC CGT ATC GCG GAG TGG GCG GAT ATT ACC AAT						569
Tyr Ser Ser Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn						
105	110	115				120
GCA CAC GGC GTC ACC GGC CCC GGT GTG ATA GCC GGG CTG AAG GAG GCT						617
Ala His Gly Val Thr Gly Pro Gly Val Ile Ala Gly Leu Lys Glu Ala						
125	130	135				
GCG AAA CTG GCC TCA CAG GAA CCC AGG GGG TTG CTG ATG CTG GCA GAG						665
Ala Lys Leu Ala Ser Gln Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu						
140	145	150				



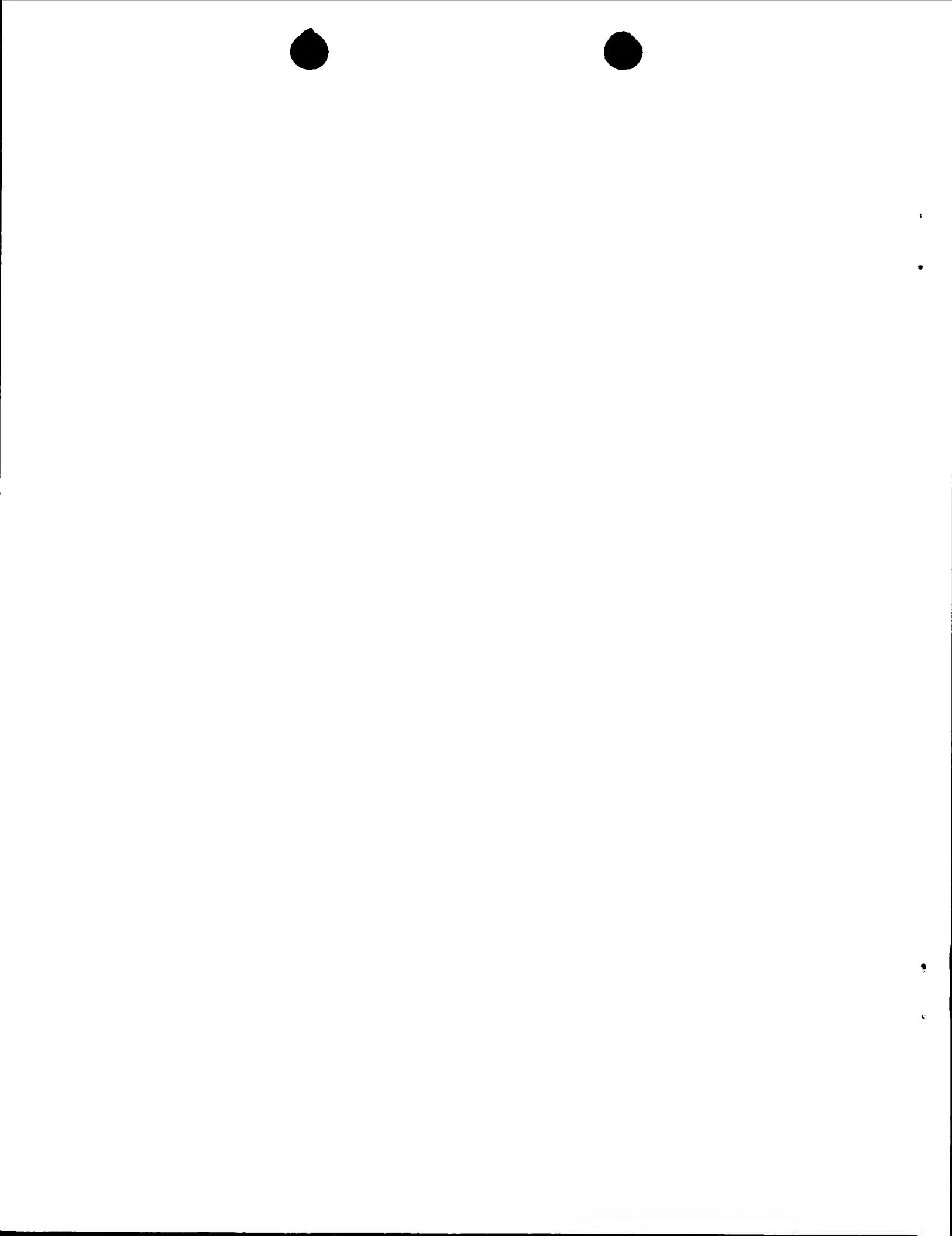
CTC TCT TCT CAG GGC TCT TTG GCG CGC GGA GAC TAT ACC GCG GGC GTC	713
Leu Ser Ser Gln Gly Ser Leu Ala Arg Gly Asp Tyr Thr Ala Gly Val	
155 160 165	
GTT GAA ATG GCG AAG CTG GAC GAA GAC TTT GTG ATC GGG TTC ATC GCG	761
Val Glu Met Ala Lys Leu Asp Glu Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala	
170 175 180	
CAG CGT GAC ATG GGT GGG CGT GCA GAC GGC TTT GAC TGG CTC ATC ATG	809
Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Ala Asp Gly Phe Asp Trp Leu Ile Met	
185 190 195 200	
ACC CCG GGG GTT GGC CTG GAC GAC AAA GGA GAC GGC CTG GGC CAG CAG	857
Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln	
205 210 215	
TAC CGC ACG GTG GAT GAG GTC GTC AGC GAC GGT ACC GAT GTG ATC ATT	905
Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val Ser Asp Gly Thr Asp Val Ile Ile	
220 225 230	
GTT GGC AGA GGG CTC TTT GAC AAG GGA AGA GAC CCC AAG GTC GAG GGT	953
Val Gly Arg Gly Leu Phe Asp Lys Gly Arg Asp Pro Lys Val Glu Gly	
235 240 245	
GCC CGC TAC CGC AAG GCC GGT TGG GAG GCT TAC TTG CGC CGT ATG GGC	1001
Ala Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Met Gly	
250 255 260	
GAG ACT TCG TAGTCTATCG CTGGCGCCCA CAGTATATAG GCGGATTCCA	1050
Glu Thr Ser	
265	
CCGCCGATTA CCATCTCAGC AACCTTTTG TAATTATATG CCCCTATTGC CCTTATTCC	1110
GAGCTGGTGC CGGGATCGGT TTATAGACGG GCAACAAGTT GATACTTTGT TCAGTAGCAT	1170
GCATCCAACA CTTGCAGGCT TGGGGTGTGG AAGGCCTCGC CGCGGATAAT TCGTATTACC	1230
CGCACTTCGT GAAAGTATTGC TTTATGAAAA ATCTTCACCT TGGGCTAACT AGAGCCATAA	1290
CTCGACACAA GCCCCTTCCT ACACACTTCG AGCTGGGACT AAAGTGACAA CGAATAGCAA	1350
ATAATTAGCA AATATGGATG CGTTGAATT	1380

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 267 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:



Met Ser Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Arg Ala Lys Ala His Asn Ser Pro  
1 5 10 15

Val Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu Met His Glu Lys Lys Thr Asn Leu  
20 25 30

Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ser Arg Lys Leu Leu Glu Leu Ala  
35 40 45

Asp Thr Leu Gly Pro His Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile  
50 55 60

Leu Thr Asp Phe Asp Ile Glu Thr Thr Val Lys Pro Leu Gln Gln Leu  
65 70 75 80

Ala Ala Lys His Asn Phe Met Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp  
85 90 95

Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln Tyr Ser Ser Gly Val Tyr Arg Ile  
100 105 110

Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Pro Gly  
115 120 125

Val Ile Ala Gly Leu Lys Glu Ala Ala Lys Leu Ala Ser Gln Glu Pro  
130 135 140

Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Gln Gly Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Arg Gly Asp Tyr Thr Ala Gly Val Val Glu Met Ala Lys Leu Asp Glu  
165 170 175

Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Ala  
180 185 190

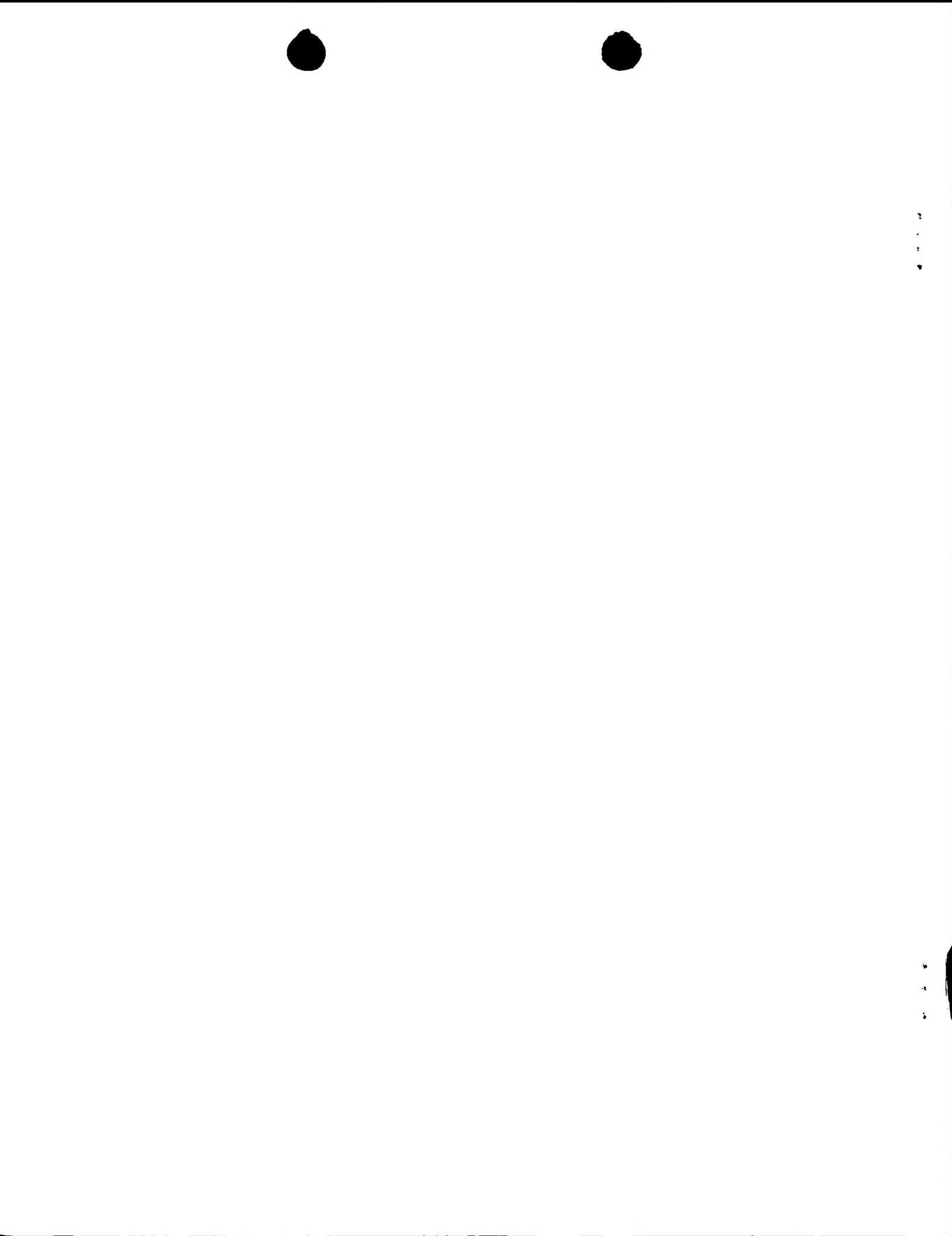
Asp Gly Phe Asp Trp Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp  
195 200 205

Lys Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val  
210 215 220

Ser Asp Gly Thr Asp Val Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Asp Lys  
225 230 235 240

Gly Arg Asp Pro Lys Val Glu Gly Ala Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp  
245 250 255

Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Met Gly Glu Thr Ser  
260 265



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/52, C07K 14/37, C12P 25/00, C12N 15/80, 9/88</b></p>		A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/36432</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>22. Juli 1999 (22.07.99)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/08382</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. Dezember 1998 (18.12.98)</b></p>		<p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(30) Prioritätsdaten: 198 01 120.2 15. Januar 1998 (15.01.98) DE</p>		<p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>19. August 1999 (19.08.99)</b></p>	
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>			
<p>(72) Erfinder; und</p>			
<p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): POMPEJUS, Markus [DE/DE]; Lerchenstrasse 72, D-67165 Waldsee (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo, 11, 4E, E-37001 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; Versalles, 7, E-37009 Salamanca (ES).</p>			
<p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>			
<p>(54) Title: OROTIDINE 5'-PHOSPHATE DECARBOXYLASE-GENE, GENE CONSTRUCT CONTAINING SAID GENE AND THE UTILIZATION THEREOF</p>			
<p>(54) Bezeichnung: OROTIDIN-5'-PHOSPHATDECARBOXYLASE-GEN, GENKONSTRUKT ENTHALTEND DIESES GEN UND SEINE VERWENDUNG</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof, a gene construct containing said gene or the homologues thereof and the utilization of the same. The invention also relates to vectors or organisms containing an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof. In addition, the invention relates to a method for producing uracil auxotrophic microorganisms and to a method for introducing DNA in uracil auxotrophic microorganisms.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen Verwendung. Die Erfindung betrifft ausserdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.</p>			

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Maurenien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08382

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/52 C07K14/37 C12P25/00 C12N15/80 C12N9/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5 October 1995 cited in the application see example 1 ---	1-5
Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, vol. 29, 1 January 1984, pages 113-124, XP002092104 cited in the application see figure 5 ---	1-5 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

### Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29 June 1999

12/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 98/08382

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 215, 5 October 1990, pages 403-410, XP000604562 cited in the application see the whole document ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30 January 1997 cited in the application see page 1, line 1 - page 5, line 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28 May 1980 see figure 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast <i>Candida glabrata</i> " GENE, vol. 142, 1994, pages 135-140, XP002106569 see figure 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in <i>Aspergillus fumigatus</i> using the orotidine-5'-decarboxylase gene, <i>pyrG</i> , as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, vol. 30 (1), 1996, page 76-82 XP002107254 see the whole document ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of <i>Mucor circinelloides</i> OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , vol. 248 (2), 1995, page 126-135 XP002107255 see the whole document ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast <i>Yamadazyma (Pichia) ohmeri</i> " YEAST , vol. 10, no. 12, 1994, pages 1601-1612, XP002107256 cited in the application see the whole document ---	1,4,6-9, 12
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08382

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556" YEAST, vol. 9, no. 6, 1993, pages 677-681, XP002107257 cited in the application see the whole document -----	1, 4, 8-10, 14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

Final Application No

PCT/EP 98/08382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 4420785	A 05-10-1995	CA	2186403 A	05-10-1995
		CN	1146781 A	02-04-1997
		WO	9526406 A	05-10-1995
		EP	0751995 A	08-01-1997
		JP	9510618 T	28-10-1997
		US	5821090 A	13-10-1998
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9703208	A 30-01-1997	DE	19525281 C	04-04-1996
		DE	19545468 A	21-08-1997
		CA	2223877 A	30-01-1997
		CN	1193356 A	16-09-1998
		EP	0839211 A	06-05-1998
-----	-----	-----	-----	-----
EP 0011562	A 28-05-1980	FR	2441659 A	13-06-1980
		JP	55077889 A	12-06-1980
		US	4387162 A	07-06-1983
-----	-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. Aktenzeichen  
PCT/EP 98/08382

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 6 C12N15/52 C07K14/37 C12P25/00 C12N15/80 C12N9/88		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) IPK 6 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5. Oktober 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiel 1 ---	1-5
Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, Bd. 29, 1. Januar 1984, Seiten 113-124, XP002092104 in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 5 ---	1-5
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "-Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29. Juni 1999		12/07/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Mateo Rosell, A.M.

## INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

nales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/08382

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 215, 5. Oktober 1990, Seiten 403-410, XP000604562 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28. Mai 1980 siehe Abbildung 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast <i>Candida glabrata</i> " GENE, Bd. 142, 1994, Seiten 135-140, XP002106569 siehe Abbildung 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in <i>Aspergillus fumigatus</i> using the orotidine-5'-decarboxylase gene, <i>pyrG</i> , as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, Bd. 30 (1), 1996, Seite 76-82 XP002107254 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of <i>Mucor circinelloides</i> OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , Bd. 248 (2), 1995, Seite 126-135 XP002107255 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast <i>Yamadazyma (Pichia) ohmeri</i> " YEAST, Bd. 10, Nr. 12, 1994, Seiten 1601-1612, XP002107256 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,4,6-9, 12
		-/-

**INTERNATIONALER RECHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08382

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>3</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556" YEAST, Bd. 9, Nr. 6, 1993, Seiten 677-681, XP002107257 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1, 4, 8-10, 14

INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

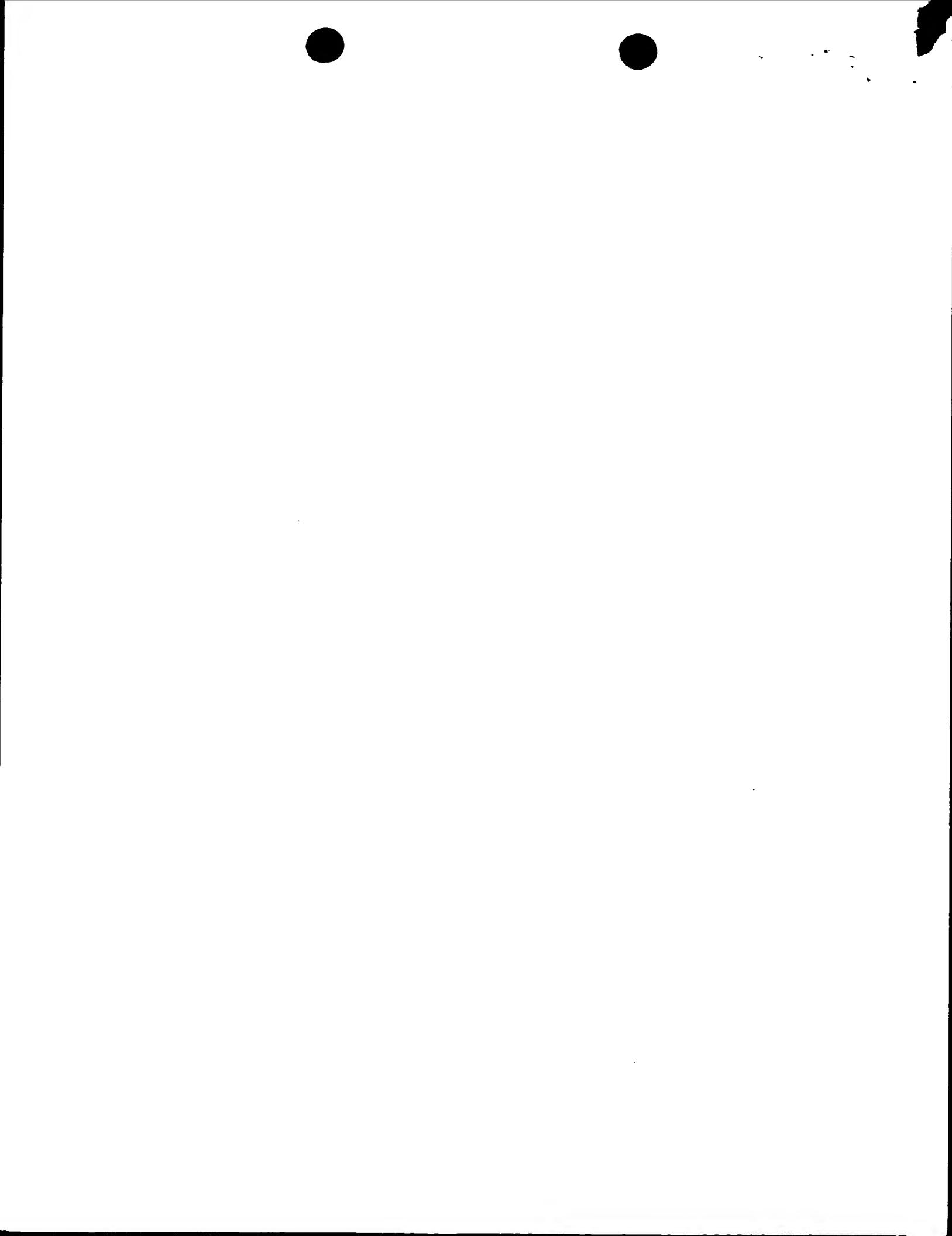
als Aktenzeichen

PCT/EP 98/08382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4420785	A 05-10-1995	CA	2186403 A	05-10-1995
		CN	1146781 A	02-04-1997
		WO	9526406 A	05-10-1995
		EP	0751995 A	08-01-1997
		JP	9510618 T	28-10-1997
		US	5821090 A	13-10-1998
WO 9703208	A 30-01-1997	DE	19525281 C	04-04-1996
		DE	19545468 A	21-08-1997
		CA	2223877 A	30-01-1997
		CN	1193356 A	16-09-1998
		EP	0839211 A	06-05-1998
EP 0011562	A 28-05-1980	FR	2441659 A	13-06-1980
		JP	55077889 A	12-06-1980
		US	4387162 A	07-06-1983

We claim:

1. An orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs which have at least 80% homology with the sequence SEQ ID NO: 1.
- 5 2. A homolog as claimed in claim 1, whose gene product encoded thereby is functional.
- 10 3. An orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs, wherein the gene or its homologs derives from *Ashbya gossypii*.
- 15 4. An amino-acid sequence encoded by a gene or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3.
5. An amino-acid sequence as claimed in claim 4, which comprises an enzymatically active protein.
- 20 6. A gene construct comprising an orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3, where the gene or its homologs is functionally linked to one or more regulatory signals.
- 25 7. A gene construct as claimed in claim 6, whose gene expression is increased by the regulatory signals.
- 30 8. A vector comprising a gene construct as claimed in claim 6 or 7.
9. A microorganism comprising at least one gene construct as claimed in claim 6 or 7.
- 35 10. A process for producing uracil-auxotrophic microorganisms, which comprises modifying an orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3 in such a way that the protein encoded by the gene is inactive, and this modified gene being introduced into the microorganisms and integrated by homologous recombination into the genome of the organisms, and subsequently these microorganisms being selected for resistance to 5-fluoroorotic acid.
- 40 45



11. A process for inserting DNA into microorganisms, which comprises inserting a vector which comprises an intact orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs as claimed in any of claims 1 to 5 3, together with at least one other gene, into a microorganism which is deficient in orotidine-5'-phosphate decarboxylase genes, and cultivating this microorganism on or in a culture medium without uracil.
- 10 12. A process as claimed in claim 11, wherein a linear DNA is used as vector.
13. A process as claimed in claim 11 or 12, wherein an *Ashbya gossypii* strain is used as microorganism deficient in 15 orotidine-5'-phosphate decarboxylase genes.
14. A process as claimed in any of claims 11 to 13, wherein at least one gene of riboflavin synthesis is inserted as other gene into the microorganism.
- 20 15. The use of a gene sequence or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3 as selection marker.
16. The use as claimed in claim 15 in *Ashbya gossypii*.

25

30

35

40

45

